



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

## **Genotoxicidad e inestabilidad genética producida por la exposición de *Allium cepa* a biocidas**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo**

### **AUTOR**

**Alfredo Miguel BERROCAL HUALLPA**

### **ASESORES**

**María Angélica SILES VALLEJOS**

**Dr. Raúl Humberto BLAS SEVILLANO (Asesor externo)**

**Lima, Perú**

**2012**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Berrocal, A. (2012). *Genotoxicidad e inestabilidad genética producida por la exposición de Allium cepa a biocidas*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## **DEDICATORIA**

La presente tesis está dedicada a mi madre que fue sustento de fortaleza y apoyo en todo momento, además a mis hermanos y en especial a Raúl que sin su ejemplo no estaría en este punto tan importante y trascendental de mi vida. Dedicado a todos los que en su momento y en sus posibilidades me extendieron su mano, tío Anselmo, tío Carlos, Freddy y papa Octavio.

A Myriam por estar en esta parte tan importante de mi vida, llenarme de fuerzas y amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los docentes de la Universidad Nacional Agraria la Molina, que mediante el Instituto de Biotecnología me brindaron su acogida y apoyo para la realización de la tesis. Así mismo, fue grato compartir el área de biología molecular a lado de buenos compañeros y grandes futuros científicos. Agradezco a Lucho Gutiérrez por la cátedra, a Joel Flores por su filosofía científica, al Dr. Raúl Blas por su asesoría y darme la oportunidad de ser parte de este gran equipo de investigación.

Gracias a los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que me acogieron y formaron por 5 años. De modo especial agradezco a la profesora María Siles, Olga Bracamonte, Elena Arbaiza y al profesor Julio Manosalva por sus correcciones y su gran apoyo.

Gracias Myriam que con tu sonrisa motivas mi vida y haces que quiera seguir creciendo cada día.

Y gracias Dios por que estar en gracia contigo significa poderlo todo.

## INDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
3.1	Formulación de la Hipótesis	10
3.2	Planteamiento de Objetivos	11
3.3	Formulación de la variable	11
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>12</b>
4.1	Material Biológico	12
4.2	Material de laboratorio	12
4.3	Reactivos de citogenética	13
4.4	Reactivos para extracción de ADN	13
4.5	Reactivos para cuantificación de ADN	14
4.6	Reactivos para AFLPs	14
<b>V.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>17</b>
5.1	Evaluación del efecto de 2 Biocidas	17
5.2	Diseño Experimental	19
5.3	Análisis Citogenético	21
5.4	Análisis Molecular	23
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>

6.1 Resultado del test de <i>Allium cepa</i>	28
6.2 Resultado del diseño experimental	30
6.3 Resultado del análisis citogenético	34
6.4 Resultado del análisis molecular	39
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES</b>	<b>48</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>49</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>59</b>
<b>XII. ADENDA</b>	<b>72</b>
12.1 Mutaciones y genotoxicidad	72
12.2 Biomonitores	72
12.3 Sistema de control del ciclo celular	72
12.4 Biocidas	73

## RESUMEN

El uso de biocidas es una constante en el campo agronómico, el daño ocasionado a los cultivos y por consiguiente el gran potencial de daño para los consumidores es conocido, sin embargo su uso sigue en marcha. Por ello se realizaron pruebas citogenéticas para la observación de aberraciones cromosómicas y caracterización molecular en *Allium cepa* usando muestras de raíces de plantas expuestas y no expuestas a biocidas. Los tratamientos se realizaron con el objetivo de comparar el grado de afectación de los biocidas sobre la mitosis y la ocurrencia de mutaciones a nivel cromosómico y molecular. El ANOVA para los datos de desarrollo radicular al finalizar la experimentación, mostraron un CV de 9.88, se observó diferencias significativas entre el control y los tratamientos, los porcentajes de inhibición llegaron a tener valores máximos de 84.2% para vertimec V8 y 76.5% para pentacloro P8, y valores mínimos de 38.2% para vertimec V0.5 y 43.8% para pentacloro P0.5. El índice mitótico fue mayor para el control (0.193) y menores para el tratamiento con menor desarrollo radicular, vertimec V8 (0.0214) y pentacloro P8 (0.0284). Las pruebas citogenéticas mostraron la ocurrencia de anomalías en el ciclo celular siendo la más frecuente la C-mitosis. Se puede concluir que el test *Allium* es un buen indicador de citotoxicidad y genotoxicidad. Los biocidas ocasionan cambios en la estructura genómica de un cultivo, estos cambios podría acumularse y ocasionar cambios a nivel de expresión, pudiendo dañar regiones de interés para una especie. Los AFLPs no mostraron diferencias a nivel de patrón de bandas entre el control y los tratamientos. A nivel molecular se tendría que usar marcadores moleculares más específicos, además de verificar si las regiones afectadas son al azar.

**Palabras clave:** test *Allium*, anomalía mitótica, estabilidad, genotoxicidad, AFLPs.

## ABSTRACT

The use of biocides is a constant in the agronomic field, damage to crops and therefore the potential for harm to consumers is known, however its use is ongoing. So cytogenetic tests were performed for the observation of chromosomal aberrations and molecular characterization of *Allium cepa* using samples of plant roots exposed and not exposed to biocides. Treatments were performed in order to compare the degree of involvement of biocides on the occurrence of mitosis and chromosome mutations and molecular level. The ANOVA for root growth data at the end of the experiment, showed a CV of 9.88, significant differences were observed between control and treatment, inhibition rates have reached maximum values of 84.2% to 76.5% Vertimec V8 for pentachloro P8, and minimum values of 38.2% to 43.8% Vertimec to V0.5 and pentachloro P0.5. The mitotic index was higher for control (0193) and lowest for the less developed root Vertimec V8 (0.0214) and pentachloro P8 (0.0284). Cytogenetic testing showed the occurrence of abnormalities in the cell cycle being the most frequent C-mitosis. AFLPs showed no differences at the level of banding pattern between control and treatment. It can be concluded that the Allium test is a good indicator of cytotoxicity and genotoxicity. Biocides cause changes in the genomic structure of a culture, these changes could accumulate and cause changes in expression level, can damage regions of interest for a species. At the molecular level will have to use specific molecular markers, in addition to verifying whether the affected regions are random.

Keywords: Allium test, abnormal mitotic stability, genotoxicity, AFLPs.



## **I. INTRODUCCIÓN**

La aplicación de biocidas en los cultivos vegetales de importancia económica para el país, es una práctica común frente a problemas de enfermedades y plagas, sin embargo a pesar de ser conocidos sus efectos tóxicos en diferentes grados, dependiendo de diversos factores, se sabe que muchos de estos provocan alguna alteración a nivel del ADN, y esto puede ser expresado a nivel citológico ( Palani L. 2007), como un fallo en la maquinaria mitótica la cual a su vez es observada con una disminución del índice mitótico y alguna anomalía en los cromosomas ( Grant W.1982) como por ejemplo la presencia de puentes anafásicos, C-mitosis, deleciones, translocaciones y fragmentos aberrantes productos de algún daño en la mitosis (Jette Rank. 2003).

Además de los efectos agudos y crónicos ya descritos, existen otros efectos de los biocidas que se presentan a muy largo plazo en la población o bien se manifiestan en otras generaciones. Estos efectos se derivan de la exposición continua a dosis bajas de una sustancia y pueden incluir una gran variedad de alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas. Entre los más importantes se encuentran la aparición de mutaciones (Olufunsho A. 2010). Comprobar la capacidad toxicológica de un compuesto es muy difícil, en particular a concentraciones normales de uso y sobre todo el detectar los niveles de concentración que se requieren para inducir mutaciones, en este aspecto muchas mutaciones que a determinadas dosis no se manifiestan se van acumulando y por consiguiente van desestabilizando la configuración genómica normal. Parte del problema radica en que en estos casos, no se puede establecer claramente la relación dosis-efecto y, por lo tanto, no es posible fijar un valor o dosis mínima capaz de provocar alteraciones. Por lo mismo, tampoco se puede establecer una concentración que sea “segura”. Por otra parte, la especificidad de los compuestos hacia cada especie en particular dificulta relacionar los efectos que causan las sustancias químicas en las plantas con los que podrían

causar en el hombre. Aun así se debe considerar que los agentes químicos que generan mutaciones, o cualquier efecto tóxico sistemático en plantas de experimentación (Grant W. 1994), teóricamente también tienen la capacidad de causar efectos en los seres humanos.

El test de *Allium cepa* viene siendo usado para el diagnóstico de toxicidad de diferentes compuestos tanto farmacéuticos, alimenticios y contaminantes (Frainer et al. 2006; Muhsin Konuk. 2007; Olusegun B. et al. 2010), esto debido a que fácilmente se pueden distinguir algunas anomalías cromosómicas, producto de un agente mutagénico, en consecuencia el obtener un diagnóstico citogenético (Ragunathan et al. 2007). Frente a la utilización de biocidas en cultivos de importancia agronómica, la utilización del test de *Allium cepa* permite obtener un buen registro de la ocurrencia de estas anomalías (Grant W. 1982; Jette Rank. 2003); existen muchos trabajos que aprovechan la facilidad de identificar efectos genotóxicos debido a diferentes contaminantes biológicos ambientales (Ukaegbu et al. 2009). El test de *Allium cepa* aprovecha la consecuencia de la disminución del índice mitótico, expresada en el menor desarrollo radicular, observando así diferencias significativas entre compuestos a distintas concentraciones, y tiempos de exposición.

El uso del test de *Allium cepa* permite determinar la toxicidad de muchos compuestos por su gran sensibilidad, es por ello que en la actualidad se viene usando para monitorear el grado toxicológico de distintos compuestos como el azufre, magnesio, boro, cromo, pesticidas, herbicidas, farmacéuticos entre otros (Clifford Peña et al. 1999; Espinoza Q. et al. 2007; Feretti et al 2007; Shukla et al. 2002; Gul Tartar et al. 2006; W. Grant 1978; Y. Mustafa et al. 2008).

El test de *Allium cepa* además, es usado en programas de biorremediación (Richa Srivastava et al. 2005), y también podría usarse en estudios de conservación.

Los marcadores moleculares AFLPs, son muy usados en la caracterización molecular debido a que analiza todo el genoma de manera exploratoria, en este sentido esta técnica podría brindar información de alguna mutación a nivel del genoma de *Allium cepa* (F. Rosales et al. 2007).

Desde su desarrollo (Vos et al, 1995), los AFLP se han convertido en el método más usado para estudios moleculares debido a las ventajas que presenta su uso. Son marcadores altamente polimórficos empleados en estudios de organismos procariotas y eucariotas. Con los AFLP se obtienen patrones de bandas en numero de 50 – 70 por vez, lo que facilita los estudios de mapeo y genotipificación, es decir, se explota al máximo la tasa de polimorfismo que presenta el organismo en estudio. El polimorfismo de AFLP entre individuos, se basa en la presencia y ausencia de los sitios de restricción del ADN genómico, ya que mutaciones puntuales pueden resultar en presencia o ausencia de bandas en el resultado final.

Este trabajo de investigación permitirá conocer el grado de afectación de vertimec y pentacloro, dos biocidas muy usados en los cultivos, los cuales pueden estar acumulando mutaciones no deseadas desde su uso en el campo agrícola, lo que ocasionaría inestabilidad genética.

## II. MARCO TEÓRICO

Los ensayos realizados con *Allium cepa*, frente a compuestos tóxicos muestran la presencia de anomalías en las diferentes fases de la mitosis, debido a la inducción de mutaciones o bloqueos en los puntos de control de la mitosis (Rank et al. 1997).

Fiskesjö, reporta que, cuando un bulbo de cebolla (*Allium cepa*) se rehidrata, se produce una estimulación del crecimiento de las células del meristemo radicular, lo cual permite la elongación de las raíces del bulbo. Sin embargo, observó que cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz (Fiskesjo G. 1985, 1988, 1993).

***Allium cepa*** es un sistema biológico que ha sido utilizado para detectar con facilidad los cambios provocados por agentes externos, (Fiskesjo G. 1985, 1988, 1993), permite observar alteraciones en sus cromosomas (mutaciones), además tiene características biológicas que facilitan la ejecución de ensayos pues posee ocho pares de cromosoma grandes. Por estas razones se le ha reconocido como uno de los sistemas biológicos más sencillos y de mayor validez citogenética en ensayos actualmente disponibles, lo que ha permitido evaluar los efectos genotóxicos de compuestos químicos (Banerjee A. 1992).

Otra técnica utilizada en las células de cebolla es la de micronúcleos, que es una prueba más sencilla, rápida y eficiente si la contrastamos con el análisis de alteraciones cromosómicas y anomalías de la división celular. Además, los micronúcleos producidos son bastante claros y se detectan fácilmente en el microscopio (Feretti D. 2007).

Las **Anomalías del ciclo celular** (ver anexo, figura 13) producidas por la exposición a sustancias tóxicas se manifiestan como alteraciones en el ciclo (Sigurbjörhsson B. 1971 y Banerjee A. 1992).

La **c-mitosis** se produce por la administración de la droga colchicina. Esta sustancia inhibe la formación del huso acromático, al llegar a metafase los cromosomas están muy condensados y con los cromátidos separados y en forma de "X" ya que las cromátidas han perdido la cohesividad entre ellas y sólo aparecen unidas por la región del centrómero. Los cromosomas aparecen perfectamente individualizados y se puede apreciar perfectamente su forma y número (Alberts et al (2004)). La **bi-mitosis** es producida por la administración de cafeína a tejidos vegetales, la cafeína inhibe la formación del fragmoplasto o tabique de separación celular, no se produce la citocinesis y los dos núcleos permanecen separados pero dentro del mismo citoplasma. En la siguiente división los dos núcleos entran de nuevo en mitosis y podemos ver biprofases, bimetafases, bianafases y bitelofases. Esta droga es utilizada para estudiar puntos de control del ciclo celular y determinar la duración del ciclo. La **mitosis multipolar** es producida mediante drogas tales como la carbetamida, que producen husos multipolares, donde los cromosomas no migran a los dos polos opuestos, sino a varios, 3 o 4, produciéndose células con distinto número de cromosomas (Paniagua R. 2002).

Una de las causas principales de la inestabilidad cromosómica son los ciclos BFB (breakage-fusion-bridge). Estos ciclos se inician cuando la maquinaria de reparación falla en el momento de reparar roturas de la cadena del ADN y/o ante la presencia de extremos cromosómicos (telómeros) acortados. Cuando esto pasa, se producen fusiones cromosómicas incorrectas que favorecen la aparición de unas estructuras denominadas **puentes anafásicos** en la división celular. Estos puentes se pueden romper y generar otras roturas que pueden desembocar en la formación de nuevos puentes. De esta manera la célula entra en un ciclo persistente de fusión-puente-rotura

(ciclo BFB). A menudo, los fragmentos cromosómicos generados por la rotura de los puentes anafásicos se acaban separando del resto de material genético y formando unas estructuras denominadas micronúcleos (Feretti D., et al. 2007). Debido a su relación con los puentes anafásicos, los micronúcleos se consideran un buen indicador de inestabilidad cromosómica. Aun así, esta no es la única manera de generar micronúcleos, cuando las células son expuestas a radiación ionizante, se producen roturas en las cadenas del ADN que, si no son reparadas, pueden generar fragmentos cromosómicos sin centrómero que darán lugar a micronúcleos. Los **micronúcleos** (MN) se presentan en células en división que contienen rupturas de cromosomas por pérdida de los centrómeros (fragmentos acéntricos) o pérdida de cromosomas completos, en ambos casos son incapaces de viajar con el resto de los cromosomas a través del huso mitótico, a los polos del núcleo celular durante la anafase. En la telofase las estructuras cromosómicas son envueltas por la membrana nuclear y, tanto los cromosomas completos, como los fragmentos de cromosomas retardados, asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal de la célula (entre 1/16 y 1/3 del núcleo principal) y generalmente tiene la misma coloración del núcleo (Fenech M. 1993).

Los **Marcadores AFLPs** (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) son un tipo de marcador molecular que está basado en la fragmentación del ADN genómico mediante enzimas de restricción y en la subsecuente amplificación de algunos de esos fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Vos P. y Hoger R. 1995). Es una herramienta poderosa de análisis del genoma dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética (Prado, M., et al. 2007). El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar (Carolan, J., et al. 2002).

El ensayo de AFLP consiste esencialmente en cuatro etapas. En la primera de ellas el ADN genómico se corta o digiere con dos enzimas de restricción. Generalmente una de ellas es de corte raro (ej. EcoRI), que reconoce de 6 a 8 pares de bases y otra es de corte frecuente (ej. MseI) que reconoce 4 pares de bases. En una segunda etapa, los fragmentos de ADN doble cadena de 20 a 30 pares de bases llamados adaptadores se ligan en forma específica a los extremos de los fragmentos obtenidos en el paso anterior, generando así el molde para la amplificación posterior del ADN. En una tercera etapa se amplifican selectivamente fragmentos por PCR. En esta etapa, se utilizan iniciadores de aproximadamente 20 nucleótidos que contienen una secuencia específica complementaria a la secuencia de los adaptadores y además, de uno a tres nucleótidos selectivos adicionales de secuencia arbitraria en su extremo 3'. Dado que sólo una subpoblación de los fragmentos originales es amplificada, se obtiene un patrón de bandas que permite un registro adecuado. La amplificación descrita en la tercera etapa se realiza en dos pasos: una primera amplificación selectiva empleando un nucleótido arbitrario (amplificación +1 o preamplificación) y luego, este producto de amplificación obtenido es empleado como molde en una nueva amplificación empleando iniciadores que poseen dos nucleótidos selectivos adicionales al anterior (amplificación +3 o amplificación final). La cuarta y última etapa del ensayo AFLP involucra el análisis de los fragmentos amplificados, la cual se realiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Vos P. y Hoger R. 1995).

La base genética del polimorfismo que se observa en los ensayos AFLP, o sea, la ausencia o presencia de fragmentos amplificados de un tamaño dado, está determinada por mutaciones puntuales, inversiones, inserciones y deleciones que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción o la alteración de la secuencia reconocida o amplificada por los iniciadores (Carolan, J., et al. 2002). Al igual que en los RAPDs, no es posible distinguir individuos heterocigotas por lo que se trata de un marcador dominante. Una banda AFLP se suele interpretar como un locus, definido

por las dos enzimas de restricción, una combinación de cebadores o iniciadores que incluyen las bases selectivas (Ej. EcoRI-ATC/MseI-AAG) y un peso molecular (Rosales F. y Molina L. 2007). Estos marcadores presentan un alto poder de detección de la variabilidad genética, ya que se explora simultáneamente el polimorfismo de ausencia/presencia de sitios de restricción (como lo hacen los RFLP) y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias (como lo hacen los RAPDs). Es un marcador mucho más robusto que los RAPDs, ya que en la amplificación se utilizan oligonucleótidos de cadena más larga, lo que aumenta significativamente la especificidad de la reacción sin perder las ventajas de la amplificación de secuencias al azar: de hecho, la implementación del ensayo AFLP no requiere información previa de la secuencia del genoma que se desea analizar. Asimismo, se pueden emplear distintas enzimas de restricción e iniciadores selectivos, lo que genera una ilimitada posibilidad de hallar polimorfismos. Otra ventaja de los AFLPs es el número de fragmentos (o marcadores) obtenidos por reacción y resueltos por electroforesis (oscila entre 30 - 50 contra los 4 – 10 de RAPDs), (Rosales F., L. Molina. 2007).

La necesidad de producir una mayor cantidad y calidad de alimentos trajo como consecuencia el uso intensivo de los **biocidas** durante los últimos 50 años (Chaverri, *et al.* 2000). El uso creciente y la inadecuada manipulación de estas sustancias despertaron inquietudes sobre los riesgos y daños que podrían provocar en la economía, el ambiente y la salud pública (Jiménez. 1995). Los biocidas representan problemas de intoxicación para las personas que manipulan, aplican o trabajan con estos productos. De acuerdo al tipo de toxicidad, estas sustancias afectan el crecimiento y la sobrevivencia por factores reproductivos, y en el caso de toxicidad aguda podrían causar la muerte de los organismos expuestos (Baradon y Frixione 1982). Estudios epidemiológicos los han asociado con cáncer gástrico, de piel, riñones, hígado, próstata, testículos en individuos expuestos; además de sarcomas, leucemia, mielomas y otros (Wesseling 1997).



Vertimec y Pentacloro son dos biocidas muy usados en el campo agrícola, se sabe de su toxicología producida en animales experimentales. Para vertimec se indica que los ensayos realizados para un amplio rango de cultivos, no se encontró fitotoxicidad. Para pentacloro se indica que no produce fitotoxicidad siempre que se use en las dosis indicadas. No existe investigación que indique daños producidos en el material genético de la planta tratada con estos dos biocidas.

### **III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Formulación de la Hipótesis**

##### **3.1.1 Hipótesis general**

Los biocidas afectan la estabilidad genética.

##### **3.1.2 Hipótesis nula**

Los biocidas no afectan la estabilidad genética.

##### **3.1.3 Hipótesis alterna**

Los biocidas producen bloqueo de la mitosis, ocasionando la disminución del índice mitótico.

El efecto citotóxico de los biocidas se manifiesta con la presencia de aberraciones cromosómicas.

La mutación producto de la toxicidad puede ser detectada nivel molecular

### **3.2 Objetivo**

#### **3.2.1 Objetivo general**

Comparar el grado de afectación de los biocidas sobre la mitosis observado con una disminución del desarrollo radicular usando el test de *Allium cepa*.

#### **3.2.2 Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de los biocidas a diferentes concentraciones.

Comparar los índices mitóticos producidos por biocidas.

Evaluar aberraciones cromosómicas producto de la acción de biocidas

Evaluar anomalías mitóticas producidas por biocidas.

Evaluar la mutación usando marcadores moleculares.

### **3.3 Formulación de la Variable**

**3.3.1 Variable independiente:** los tratamientos de exposición a biocidas (vertimec, pentacloro y testigo), condiciones de luz, temperatura, tiempo de exposición a los biocidas.

**3.3.2 Variable dependiente:** la respuesta de *Allium cepa* frente a los distintos tratamientos en condiciones de luz, temperatura y tiempo de exposición.

## **IV. MATERIALES**

### **4.1 Material biológico**

Se utilizó *Allium cepa*, variedad Israel (pisco), 55 bulbos.

### **4.2 Materiales de laboratorio**

Balanza digital (precisión 0.001g)

Probeta (100ml, 20ml)

4 botellas de de vidrio (500ml)

Termómetro

Bisturí

Laminas porta y cubre objeto

Aceite de inmersión

Papel filtro

Esmalte blanco

Pinza, estiletes.

Microscopio (ZEISS - E100)

Cámara fotográfica digital (zoom óptico 4X, 10 megapíxeles, Sony DSC-W530)

Congeladora (-20°C) (COLDEX Ch-10P)

Autoclave (INDUMELAB, OPA-18-D)

Baño María, PRECISION (Ventaja, 2000)

Centrifuga (BIO RAD- Model 14K)

Microtubos - Eppendorf (1.5 ml)

Micropipetas y Tips (1ul-10ul; 2-20ul; 10ul-200ul; 100ul-1000ul)

Cámara con emisión de luz UV (ULTRA-LUM 3-4400)

Cámara Electroforética vertical (Sequi-Gen GT System, BIO RAD)

Termociclador (GeneAmp – PCR System 9700)

#### **4.3 Reactivos para citogenética**

Fijador carnoy (Etanol: ácido acético (3:1))

HCL 1N

Solución Targa

Orceína acética (2%)

#### **4.4 Reactivos para la extracción de ADN**

##### **CTAB 2X (1 lt)**

Tris HCL 1 M pH 8.00	100ml
NaCl	81.81gr
EDTA 0.5 M	40ml
CTAB	20gr
PVP (polyvinilpirrolidone)	10gr

##### **CTAB 10X (50ml)**

NaCl	2.05gr
CTAB	5 gr
EDTA 0.5 M pH 8.00	5ml

**T10E1 (Tris EDTA)**

Tris HCL 1 M pH 8.00	4ml
EDTA 0.5 M pH 8.00	0.8ml

**4.5 Reactivos para la cuantificación de ADN**

SALB 10x	50ml
Azul de Bromofenol	75mg
Xilene cianol	75mg
Orange G	100mg
TBE 10x	2.5ml
Sucrosa	30gr

**TBE 10x (1litro)**

Tris base	108gr
Acido bórico	55gr
EDTA 0.5 M pH 8.00	40ml

**4.6 Reactivos para AFLP****Digestión**

10ul DNA (50ng/ul)

1 µl EcoRI NEB (10,000U/ml) = 10U

0.50µl MseI NEB (10,000U/ml) = 5U

2 µl 10x NEB #2 Buffer

2.0 µl BSA 10X (1mg/ml)

20 µl ddH<sub>2</sub>O

## **Ligación**

Master Mix 1Rx:

1.0µl EcoRI DS adapter 1+2

1.0µl MseI DS adapter 1+2

2.5 µl 10X Ligase Buffer from NEB

0.3 µl T4 ligase NEB (400000U/ml)

0.2 µl ddH<sub>2</sub>O

## **Pre Amplificación**

RL stock 5.0 µl (digerido y ligado)

T10E0.1 20.0 µl

**Pre AFLP :** Master Mix 1Rx

14.05 ul H<sub>2</sub>O

2.5ul 10X PCR Buffer

1.25ul dNTP mix(5mM)

1.0ul EcoRI+0 primer (10uM)

1.0ul MseI+0 primer (10uM)

0.2ul Taq polymerase

5ul RL (1:5)

### **Amplificación selectiva 1Rx**

H2O	hasta 10ul
1.1ul	10X PCR Buffer
0.6ul	dNTP (5mM)
2.0ul	EcoRI+3 primer (50 ng/ul)
0.3ul	MseI+3 primer (50 ng/ul)
0.15ul	Taq polymerase from NEB
2ul	DNA pre-amplificado

Cuadro 1 - Combinación de cebadores utilizados

Eco+AAC/Mse+CAG	E32M49 = <b>A</b>
Eco+ACA/Mse+CAC	E35M48 = <b>B</b>
Eco+ACT/Mse+CAC	E38M48 = <b>C</b>
Eco+AGA/Mse+CAG	E39M49 = <b>D</b>
Eco+AGT/Mse+CAG	E42M49 = <b>E</b>
Eco+ATG/Mse+CAG	E45M49 = <b>F</b>



## **V. METODOLOGIA**

### **5.1 Evaluación del efecto de dos biocidas**

Para la experimentación se seleccionaron 55 bulbos de cebolla de 100 gramos aproximadamente, secos y sin formación de hojas y/o raíz.

Previo al montaje del experimento, los bulbos fueron limpiados mediante la eliminación de la epidermis seca y remoción de los restos de tejido y raíces del área radicular, sin dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejidos fue conveniente colocar los bulbos en agua destilada por dos horas y secar.

Previo al montaje del diseño experimental se hizo el monitoreo para la determinación del tiempo óptimo de corte de ápices meristemáticos, para esto se trabajó en el rango de 7 am a 1pm utilizando 24 cebollas con las mismas características.

#### **5.1.1 Preparación de diluciones**

Se utilizó agua dura para el control, así como para la preparación de las diluciones de los biocidas Vertimec (Vertimec - Syngenta) y Pentacloro (Pentacloro saume).

Se empleó el método de dilución en forma secuencial aplicando un factor de 1X que representa la dosis de uso recomendada, obteniendo así las siguientes concentraciones: 0.5x, 1x, 2x, 4x y 8x para cada biocida.

([www.syngenta.com/country/cl/cl/soluciones/proteccioncultivos/Paginas/Vertimec.aspx](http://www.syngenta.com/country/cl/cl/soluciones/proteccioncultivos/Paginas/Vertimec.aspx))

([www.serfi.com.pe/INTERIOR/productos\\_peru/pentacloro\\_saume.html](http://www.serfi.com.pe/INTERIOR/productos_peru/pentacloro_saume.html))

Con los valores de concentración determinados se procedió a establecer la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ).

### 5.1.2 Ensayo

Las pruebas se realizaron en frascos de ensayo de 12 cm de longitud x 5 cm de diámetro. Es importante señalar que la profundidad de los recipientes fue tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcanzo el fondo del recipiente.

En la prueba se utilizaron cinco concentraciones (0.5X, 1X, 2X, 4X y 8X) por biocida y un control, cada una con 5 réplicas, contándose un total de 55 unidades experimentales, por ello se rotulo los frascos con V0.5, V1, V2, V4, V8 para vertimec, P0.5, P1, P2, P4, P8 para pentacoloro y C para el control, todos con 5 replicas. El ensayo se inició con el llenado de los frascos con cada una de las diluciones y controles; este llenado se hizo cerca al borde del frasco. A continuación se colocaron los bulbos limpios sobre la boca del frasco, cuidando que la zona radicular quedara inmersa en el líquido.

En cada periodo de evaluación se midió la longitud promedio de las raíces. Para cada cebolla se realizó la medición de todas las raíces emergentes y se calculó el promedio, el cual representa el valor de medición para dicha unidad experimental (los dos valores más extremos se descartan). Las evaluaciones se hicieron a los 3, 6, 9 y 12 días de exposición. Para obtener el porcentaje del efecto de inhibición se realizó la siguiente operación:

$$\text{Coeficiente de Inhibición (CI)} = (L.C - L.T) \times 100/L.C$$

L.C: longitud del control

L.T: longitud del tratamiento

Con estos valores se construyo una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calcula la CI50 (coeficiente de inhibición media).

### 5.1.3 Control de calidad del material biológico

Dado que la prueba con cebollas no requirió mantenimiento de un cultivo, el control de calidad se enfatizó en la calidad de los lotes de material a utilizar. Por esa razón, se dio especial importancia al almacenamiento del material, así como al control de hongos que pudieran afectar la viabilidad de las cebollas y su normal desarrollo. Es por ello que se vio recomendable disponer de un número de cebollas de por lo menos 3 ó 4 veces mayor al requerido para las pruebas. Su almacenamiento se realizó en ambiente exento de humedad, a una temperatura entre 24 – 26 °C.



Figura 1 – Instalación del Experimento, distribución completamente al azar de unidades experimentales (frascos con cebolla).

### 5.2 Diseño experimental

El **diseño completamente aleatorio (DCA)** consiste en la asignación de los tratamientos en forma completamente aleatoria a las unidades experimentales (individuos, grupos, parcelas, jaulas, animales, insectos, etc.). Debido a su aleatorización irrestricta, es conveniente que se utilicen unidades experimentales de lo más homogéneas posibles: animales de la misma edad, del mismo peso, similar estado fisiológico; parcelas de igual tamaño, etc., de manera de disminuir la magnitud

del error experimental, ocasionado por la variación intrínseca de las unidades experimentales. Este diseño es apropiado para experimentos de laboratorio, invernadero, animales de bioterio, aves, conejos, cerdos, etc. (Peña S. 1987).

Para el análisis de datos colectados se uso el DCA (diseño completamente aleatorio), ya que se trabajó con muestras homogéneas y además ante la posible pérdida de una unidad experimental ésta ajusta los resultados de manera conveniente. Se realizó el Análisis de varianza respectivo y se controló el error experimental.

### 5.2.1 Modelo estadístico asociado al diseño:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, 3, \dots, t \\ j = 1, 2, 3, \dots, n \end{array}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del tratamiento i.

$\varepsilon_{ij}$  = Error aleatorio, donde  $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

Análisis de la Varianza para el modelo  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$

Ho:  $\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_t$

Ha: al menos un efecto de un tratamiento es diferente de los demás.

Cuadro 2- Análisis de Variancia para el DCA

Fuentes de Variación (F.V.)	Grados de Libertad (G.L.)	Suma de Cuadrados (S.C.)	Cuadrados Medios (C.M.)	F <sub>0</sub>
Tratamientos	t-1	$\sum_{i=1}^t n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2$	$\frac{S.C.TRAT.}{t-1}$	$\frac{C.M.TRAT}{C.M.ERROR}$
Error	$\sum_{i=1}^t n_i - t$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$\frac{S.C.ERROR}{\sum_{i=1}^t n_i - t} = \sigma^2$	
Total	$\sum_{i=1}^t n_i - 1$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{..})^2$		

**5.2.2 Programa estadístico:** para procesar los datos se utilizo el paquete estadístico SAS, para someterlas a pruebas como DUNET, DUNCAN y TUKEY.

### 5.3 Análisis Citogenético

#### 5.3.1 Tinción cromosómica

Al finalizar el periodo de exposición se retiraron todos los bulbos de los tratamientos a frascos con agua potable, por 1-2 horas, luego recién se procedió a realizar cortes de los ápices.

Se cortaron ápices radiculares de 1-2 mm de longitud, se colocaron en una luna de reloj y se agregó la solución fijadora durante 15 minutos(a más tiempo). Se colocaron las raíces en ácido clorhídrico 1N durante 10 min. Se agregó 1 a 2 gotas de la solución Targa y se mantuvo la muestra en esta solución durante 15 min. Se cortaron las raíces en secciones transversales al eje mayor de la raíz y fueron colocadas sobre una lámina. Se añadió 1 o 2 gotas de orceína acética al 2% durante 17 min. Luego se

coloco una laminilla en 45° y se realizó el squash. Finalmente se extendió la muestra por golpeteo con la punta del lápiz.

Se observó al microscopio tratando de identificar las células que se encuentren en mitosis y fases mitóticas con anomalías (observación a 10x, 40x y 100x).

### **5.3.2 Cálculo del Índice mitótico:**

$IM = \text{Número de células en división} / \text{número de células totales}$

Índices de Fase:

$IF_p = \text{células en profase} / \text{células en división}$

$IF_m = \text{células en metafase} / \text{células en división}$

$IF_a = \text{células en anafase} / \text{células en división}$

$IF_t = \text{células en telofase} / \text{células en división}$

## **5.4 Análisis Molecular**

### **5.4.1 Procedimiento de extracción de ADN**

Se procedió a:

1. Pulverizar con nitrógeno líquido el tejido radicular colectado, aproximadamente 200 mg.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 µl y resuspender con 700 µl de buffer CTAB (2X), Adicionando 2 µl de β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.
3. Retirar de la incubadora y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 700 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclar suavemente el tubo y centrifugar 5 min a 14 000 rpm transferir el sobrenadante a otro tubo.
5. Adicionar 50 µl de CTAB (10X), mezclar suavemente para homogenizar todo el líquido.
6. Adicionar 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm transferir el sobrenadante a otro tubo.
7. Agregar  $\frac{3}{4}$  partes del volumen final (500 µl aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN. Incubar a -20 °C durante 40 min.
8. Centrifugar 20 min a 12 000 rpm y descartar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.
9. Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 70% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
10. Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 95% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
11. Permitir que el ADN (pellet) seque al aire libre por 2 horas invirtiendo el tubo. Finalmente resuspender el ADN en 80 µl de buffer T10E1 ó agua estéril (aproximadamente) y almacenar a -20 °C.

#### **5.4.2 Estimación de la cantidad de ADN**

La calidad y la concentración del ADN genómico fueron estimados comparando muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa (el Bromuro de etidio forma un complejo con el ADN que al ser expuesto a la luz ultravioleta emite fluorescencia), para ello se tomó 1 ul de ADN por muestra extraída con 9 ul de tampón de carga SALB 1X; y se cargó en un gel de agarosa al 0.5 % (con 1ul de bromuro de etidio por 100ml de TBE 1X), paralelamente a las muestras se carga 10ul del marcador de referencia de peso molecular conocido, ADN fago lambda ( $\lambda$ ) cortado con la enzima Pst1 con el fin de estimar la concentración de las muestras. La electroforesis se realizó a 90 voltios por 60 minutos utilizando como tampón de corrida TBE 1X, se visualizó en la cámara con emisión de luz ultravioleta, la imagen fue capturada con una cámara digital y un filtro de color marrón para el lente, finalmente se comparó la intensidad de cada una de las bandas usando como referencia la concentración de 280 ng/ul para la banda de mayor peso molecular (14,000pb) del ADN fago-lambda (R. Blas S. y J. Flores T, 2010).

#### **5.4.3 Procedimiento de marcadores AFLPs**

El análisis de AFLP fue el descrito por Vos et al. (1995), con modificaciones. Inicialmente 500 ng de ADN genómico de cada muestra fue digerido con EcoRI y MseI y ligado con adaptadores de doble cadena a los extremos de los fragmentos originados. Esto fue seguido de una etapa de pre-amplificación utilizando iniciadores no selectivos. La amplificación selectiva se realizó en el fragmento pre-amplificado utilizando un total de seis combinaciones de iniciadores selectivos. Los marcadores moleculares AFLPs son fragmentos de ADN (80 - 500 pb) obtenidos por restricción con endonucleasas y amplificado por PCR. La técnica involucra tres etapas: (i) restricción del ADN y ligación de los oligonucleótidos adaptadores; (ii) amplificación



selectiva de los grupos de los fragmentos de restricción; (iii) análisis en gel de los fragmentos amplificados (web referencia 13; 14; y R. Blas S. y J. Flores T. 2010).

La **Digestión** se realizó a 37°C durante 3 horas, con la enzima EcoRI y MseI.

La **Ligación** se realizó a temperatura de ambiente durante 16 horas, con adaptadores de doble cadena EcoRI 1+2 y MseI 1+2.

El **Programa de Pre-amplificación en el Termociclador** fue el siguiente:

1: 72°C 2min

2: 94°C 4min

3: 94°C 30s

4: 56°C 1min

5: 72°C 1 min

6: repetir desde el paso 3 al 5 (22 ciclos)

7: 72°C 5min

8: 4°C x  $\infty$

El producto obtenido se diluyó a una concentración de 1 en 4 con H<sub>2</sub>O y esta se utilizó en la amplificación selectiva.

**El Programa de Amplificación selectiva en el Termociclador fue el siguiente:**

- 1: 94°C x 4min
- 2: 94°C x 20s
- 3: 65°C x 30s
- 4: 72°C x 2 min
- 5: 94°C x20s
- 6: 65°C X 30s bajando 1°C por ciclo
- 7: 72°C 2 min
- 8: Repetir desde el paso 5 al 7 ---- 10 ciclos
- 9: 94°C x20s
- 10: 56°C 30 s
- 11: 72°C 2 min
- 12: repetir desde el paso 9 al 11 ---- 20 ciclos
- 13: 60°C x 30 min
- 14: 4°C

#### **5.4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Se preparó geles de poliacrilamida al 6% (7M Urea), de tamaño 24 x 40 cm y 1mm de grosor. Para ello se utilizó 60 ml de solución de poliacrilamida, 38ul de TEMED y 380ul de Persulfato de amonio al 10%. Se armó la cámara vertical, se colocó el gel y se agregó tampón de corrida TBE 1X, se cargó 6ul de producto de PCR (previamente desnaturalizado y con colorante de carga). Se dejó migrar a 1000 voltios hasta que el último colorante (Xylene Cyanol) este por salir (6 -7 horas). Alternativamente se puede dejar a 500 voltios durante toda la noche (12 – 14 horas).

#### **5.4.5 Tinción con Nitrato de Plata.**

Fijación con etanol al 10% y ácido acético al 1% en un volumen total de 1.5 litros por 25 minutos, seguida de la tinción con nitrato de plata a razón de 2.5 gramos por litro de agua destilada por 25 minutos, y el revelado con hidróxido de sodio a razón de 30gramos por litro de agua destilada y 2 ml de formaldehído por 10 minutos en movimiento. Finalmente una fijación en etanol al 10% y ácido acético al 1% en un volumen total de 1 litro por 15 minutos.

Los geles secos son escaneados y analizados.

Se observará el patrón de bandas obtenidos en los tratamientos para cada combinación de iniciadores (ver cuadro 1).

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Resultados del test de *Allium cepa*

El monitoreo de la hora adecuada para el corte de ápices de raíz en cebolla, fue entre las 9 -11 de la mañana (ver cuadro 3), en las condiciones del laboratorio (oscuridad y 26° C), teniendo como índice mitótico 17% en promedio.

Cuadro 3- Determinación de la hora de corte de ápices de raíz en cebolla

Hora	Número de cebollas (número de ápices)	Índice mitótico
7-8 am	4 ( 12 )	13.3%
8-9 am	4 ( 12 )	14.2%
9-10 am	4 ( 12 )	16.5%
10-11 am	4 ( 12 )	17.5%
11 am-12 pm	4 ( 12 )	14.3%
12-1 pm	4 ( 12 )	11.7%

En el diseño experimental se registró el tamaño de todas las raíces emergidas por unidad experimental y se cálculo el promedio de las raíces primarias (figura 2).



Figura 2- Desarrollo radicular en el día 12 en el tratamiento P0.5

Las mediciones realizadas al tercer día después de la instalación no mostraron valores estadísticamente significativos; Conforme se hicieron las siguientes mediciones se obtenían valores con diferencias significativas y valores de CV (coeficiente de variación) aceptables. En la cuarta medición mediante el análisis de varianza se obtuvo un CV de 9.88 y diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, como se muestra en el cuadro 4, además el Agrupamiento mediante Duncan ( $\alpha=0.01$ ) forma 5 grupos significativamente distintos (ver cuadro 5), mientras que el agrupamiento con Tukey forma 7 grupos distintos (anexo - matriz 1, SAS). Por otro lado la comparación de medias entre el control y los tratamientos con biocidas mediante Dunnett's mostró diferencias significativas (Anexo - matriz 1, SAS).

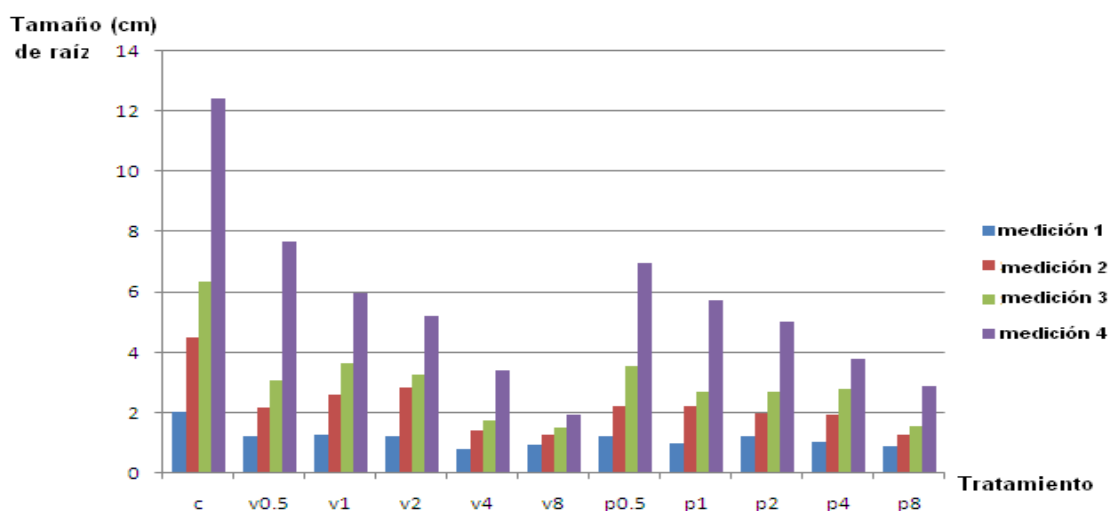


Figura 3- Desarrollo radicular de cada tratamiento por día de medición

## 6.2 Resultados del Diseño experimental

Los coeficientes de variación para las tres primeras mediciones resultaron en valores muy altos superiores a 10, por consiguiente el análisis de agrupamiento por Duncan y Tukey no eran estadísticamente aceptables. En cada medición siguiente, el coeficiente de variación fue disminuyendo, mostrando diferencias significativas entre los tratamientos y agrupamientos estadísticamente aceptables (ver cuadro 4 y 5).

### 6.2.1 ANOVA del Diseño Experimental

El análisis de varianza del ensayo para la última medición con 10 grados de libertad, con 5 repeticiones por tratamiento, con 0 unidades perdidas y un  $\alpha = 0.01$  para el análisis de agrupamiento mostró diferencias significativas entre los tratamientos y un CV de 9.88 siendo estadísticamente aceptable el experimento realizado (ver cuadro 4).

Cuadro 4- Resultados del análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F-value	P-value
Tratamientos	10	408.441	40.844	135.54	0.0001
CV= 9.88					

Cuadro 5- Agrupamiento de los tratamientos mediante Duncan (0.01)

Tratamiento	Agrupamiento Duncan (alpha=0.01)
Control	A
V0.5, P05	B
V1,V2,P1,P2	C
V4,P4,P8	D
V8	E

La comparación de medias mediante Duncan muestra 5 grupos distintos, el tratamiento V8 presenta menor tamaño de raíz, 1.96 cm, los tratamientos V1, V2, P1, P2 no muestran diferencias significativas en el tamaño de raíz (tamaño promedio 5.5 +/- 0.4 cm) y el control el mayor tamaño, 12.42 cm.

Mediante Dunnett se observó que el control es distinto a los demás tratamientos, teniendo una diferencia menor entre medias con los tratamientos V0.5 (4.7cm) y P0.5 (5.4cm), y mayor diferencia de medias con los tratamientos V8 (10.5cm) y P8 (9.5cm), sin embargo todos los tratamientos son estadísticamente muy diferentes al control (ver Dunnett's tests for variable, Anexo – matriz 1, SAS).

### 6.2.2 Coeficiente de inhibición (CI)

El coeficiente de inhibición para los tratamientos con biocidas tuvo valores mínimos de 0.382 para V0.5 y 0.438 para P0.5, y valores máximos de 0.842 para V8 y 0.765 para P8 (ver figura 4).

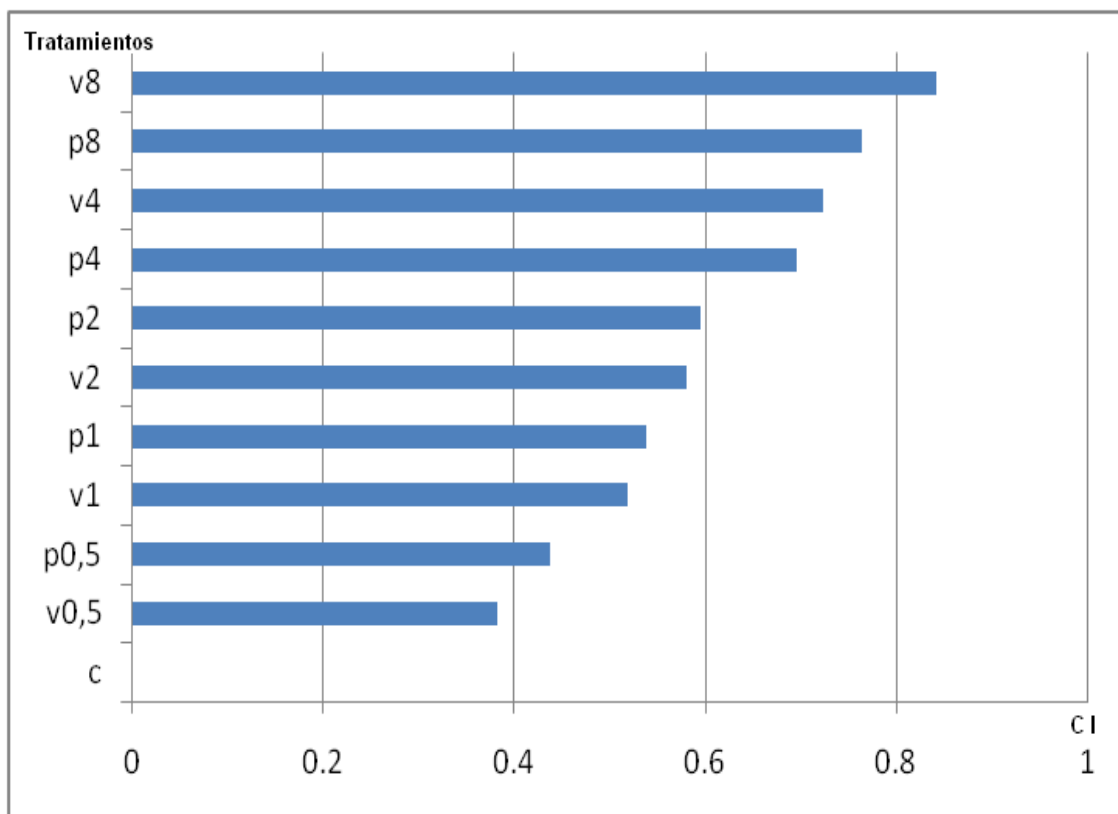


Figura 4- Coeficiente de Inhibición para el desarrollo radicular en los distintos tratamientos (diferentes concentraciones de vertimec (V) y pentacloro (P)).



### 6.2.3 Coeficiente de inhibición media ( $CI_{50}$ )

De los resultados obtenidos se calculó el  $CI_{50}$  para cada tipo de biocida, teniendo un  $CI_{50}$  de 0.91 para vertimec (figura 5) y un  $CI_{50}$  de 0.78 para pentacloro (figura 6). En ambos casos, valores cercanos a la dosis recomendada para su uso (P1 y V1).

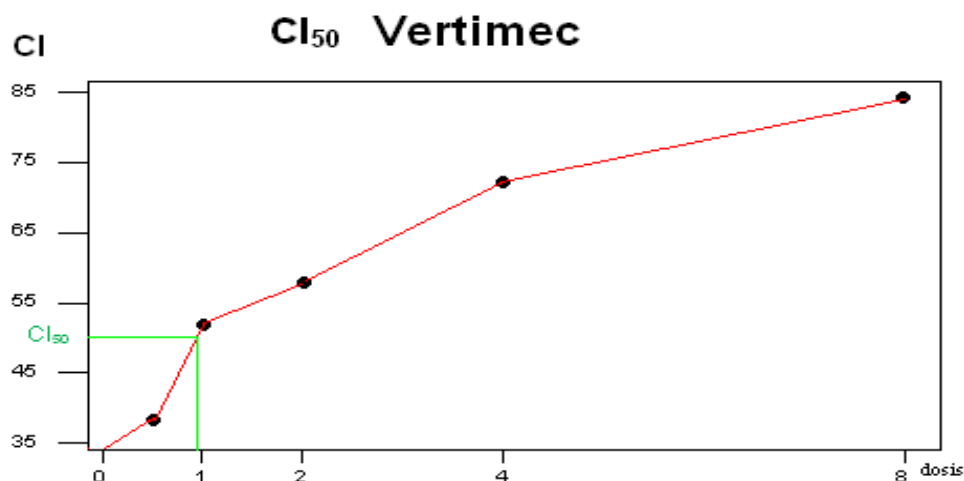


Figura 5- Estimación del  $CI_{50}$  para vertimec, cada punto representa una dosis (V0.5, V1, V2, V4, V8) en la horizontal y el porcentaje del coeficiente de inhibición del desarrollo radicular en la vertical.

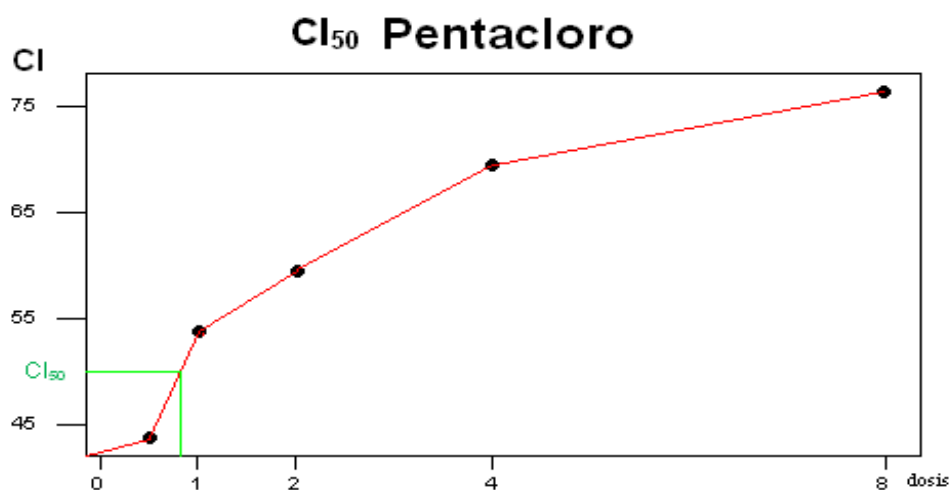


Figura 6- Estimación del  $CI_{50}$  para pentacloro, cada punto representa una dosis (P0.5, P1, P2, P4, P8) en la horizontal y el porcentaje del coeficiente de inhibición del desarrollo radicular en la vertical.

### 6.3 Resultados del análisis Citogenético

El análisis citogenético permitió conocer el índice mitótico y la presencia de anomalías en el ciclo celular.

#### 6.3.1 Tinción cromosómica

Los resultados de tinción cromosómica fueron satisfactorios, ya que permitieron diferenciar las distintas etapas del ciclo celular normal (figura 7), además permitió reconocer alguna anomalía en el ciclo de división celular.

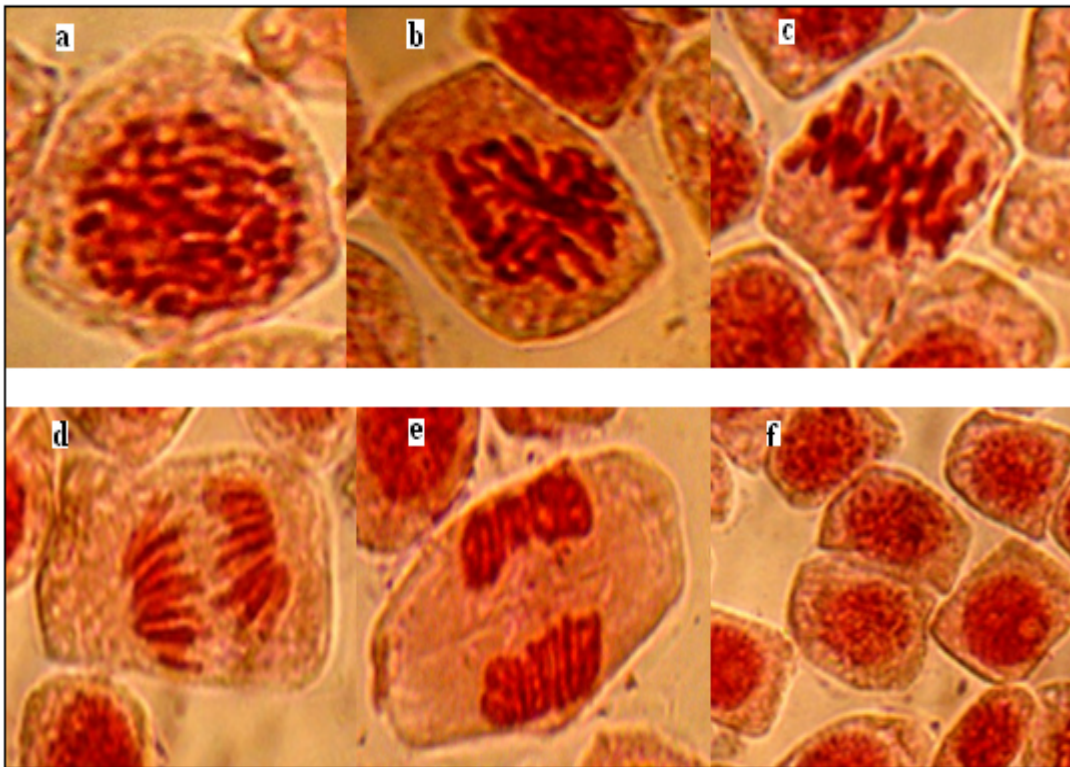


Figura 7 – Diferentes etapas del ciclo de división celular normal (en el tratamiento control); a: profase, b: prometafase, c: metafase, d: anafase, e: telofase y formación de fragmoplasto, f: citocinesis. (60X).

### 6.3.2 Índices Mitóticos

Contabilizado el número de células en mitosis y el número de células en total, se halló el IM (índice mitótico), teniendo como índice mayor al tratamiento control, 16.39%, y menores índices para los tratamientos P8 y V8, 2.8% y 2.1% respectivamente (figura 8, cuadro 8). Se calculó también el coeficiente de inhibición mitótica para cada tipo de biocida y resultó que los índices para los tratamientos P1 y V1 correspondientes a la dosis normal de uso, representan el 55 % de inhibición mitótica (cuadro 8), esto muy relacionado al coeficiente de inhibición media para el tamaño de raíz.

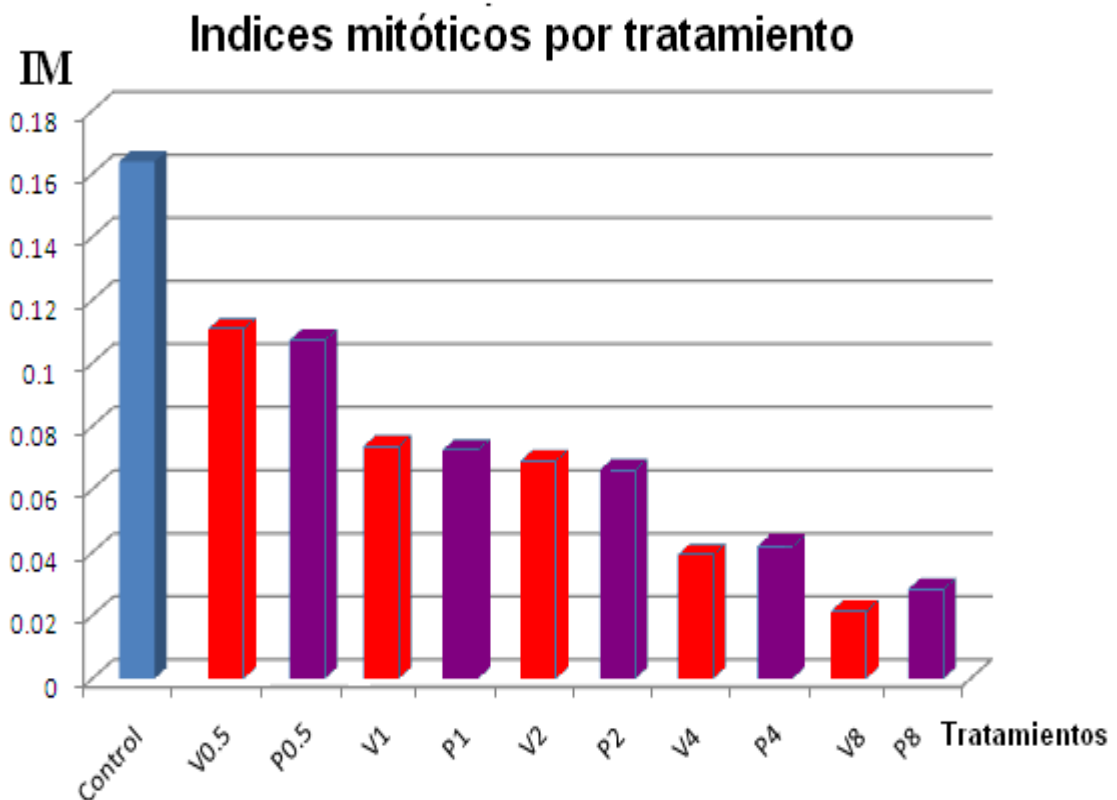


Figura 8- índices mitóticos para cada tratamiento (control y diferentes concentraciones de vertimec (V) y pentacloro (P)) en la última medición (día 12).

### 6.3.3 Presencia de Anomalías

Se observó la presencia de anomalías en el ciclo celular producido por la toxicidad de los biocidas, observándose distintos tipos de aberraciones o anomalías cromosómicas dentro de las distintas etapas del ciclo celular. En la figura 9.1 y 9.2 se observan las anomalías más comunes encontradas, en el tratamiento V0.5 se observa un puente anafásico (i), en el tratamiento P0.5 una célula binucleada con un núcleo en interfase y otro en profase (h) y una c-mitosis (m), en el tratamiento V1 una c-mitosis (b) y un puente anafásico (j), en el tratamiento P1 una C-mitosis (a), células alargadas y un fragmento cromosómico aberrante (n) y una anomalía en la anafase por el huso mitótico desorganizado (o), en el tratamiento V2 una célula binucleada y una célula en telofase posiblemente binucleada (c) y varias fusiones cromosómicas que podrían ser múltiples puentes anafásicos (g), en el tratamiento P2 una célula binucleada (d) y una c-mitosis (k), en el tratamiento V4 un puente anafásico (f), en el tratamiento P4 un fragmento cromosómico aberrante candidato a formar micronúcleo (e), y en el tratamiento P8 células alargadas y presencia de fantasmas celulares (l).

Para los tratamientos V8 y P8 muchas células estaban fragmentadas y eran de mayor tamaño, difícilmente se observó una anomalía. Según lo observado las anomalías más frecuentes eran la C-mitosis y anomalías en anafase, adicionalmente cambios en la forma celular (tamaño).

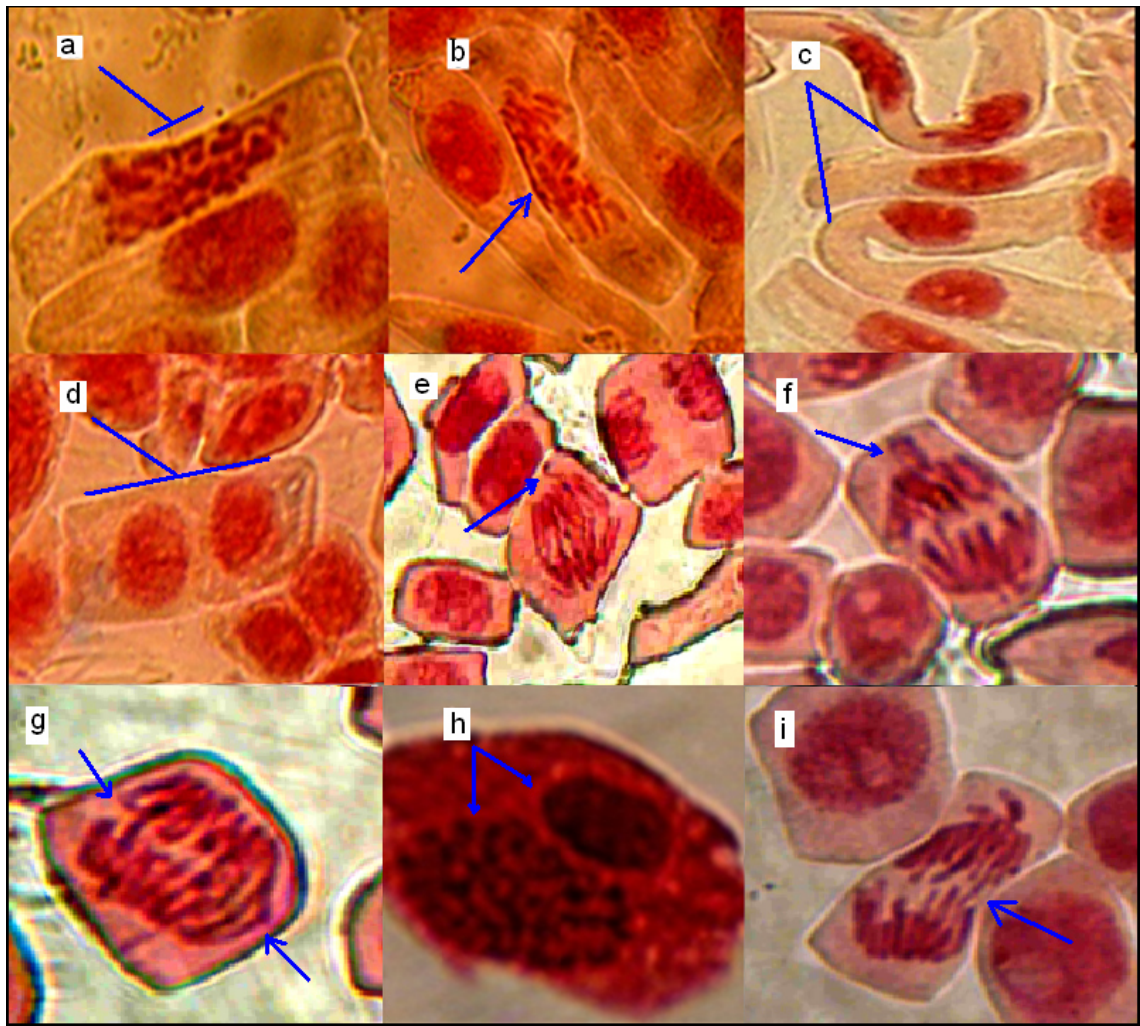


Figura 9.1 - Diferentes anomalías observadas en los tratamientos, a y b: c-mitosis, c y d: célula binucleada, e: fragmento cromosómico, f: puente anafásico, g: fusiones cromosómicas, h: célula binucleada, i: puente anafásico. (60X).



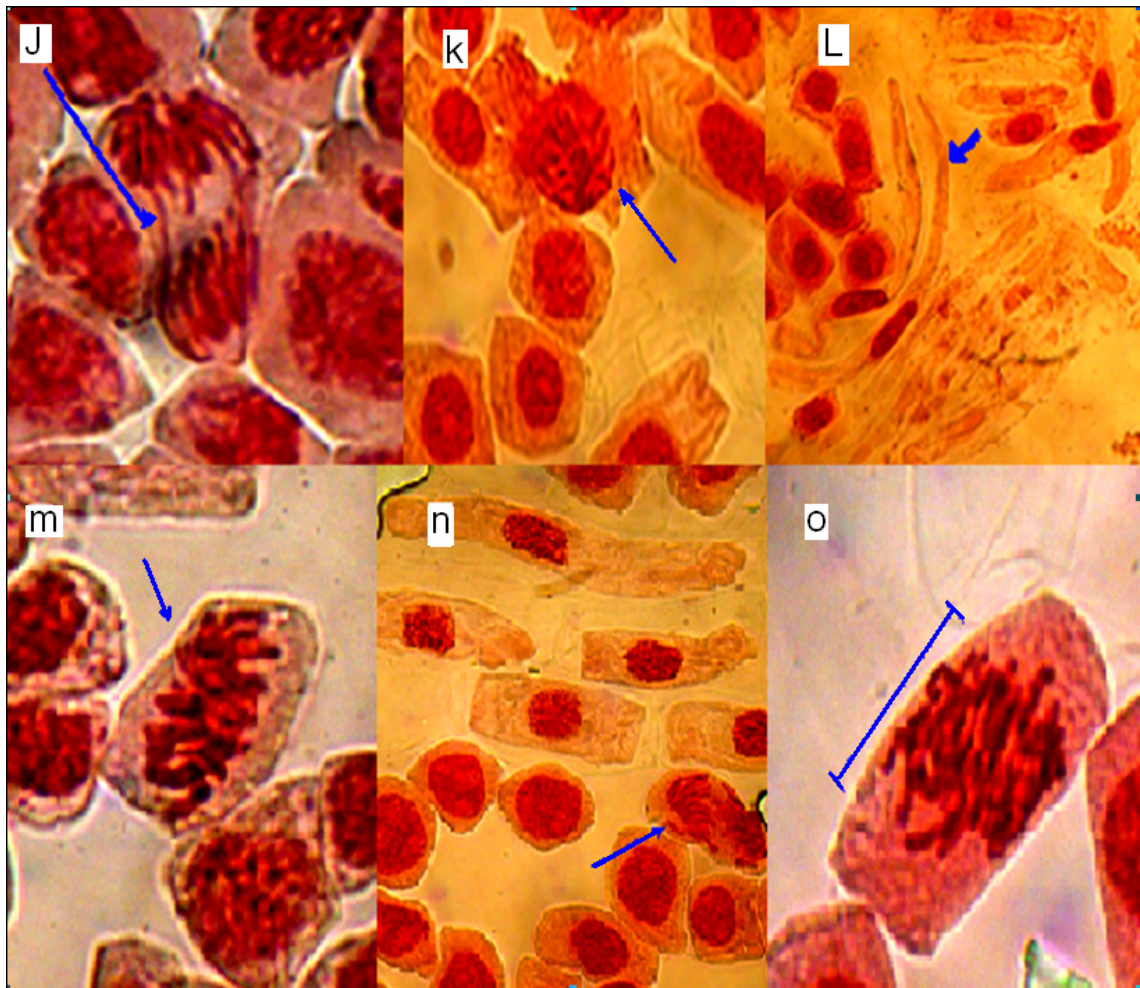


Figura 9.2 - Diferentes anomalías observadas en los tratamientos, j: puente anafásico, k: c-mitosis, l: células alargadas, m: c-mitosis, n: células alargadas y fragmento cromosómico, o: anomalía de fase. (60X).

## **6.4 Resultados del Análisis Molecular**

Inicialmente se obtuvo gran cantidad de ADN genómico (1500 ng/ul, medida al espectrofotómetro a  $\lambda$  260 nm) pero al ver la calidad en una electroforesis en agarosa se observó degradación del ADN (ver figura 14). Pasado un tiempo se volvió a observar la calidad en agarosa y se detectó que el ADN estaba completamente degradado. En consecuencia se tuvo que estandarizar una extracción de ADN con la que se consiguió tener muy buena calidad pero una baja cantidad de ADN (30+/-10 ng por ul de muestra analizada) (ver figura 10). Los AFLP mostraron uniformidad de bandas, tanto para los tratamientos como para el control.

### **6.4.1 Extracción de ADN**

Luego de seguir el protocolo inicial, variar el tiempo en baño maría y adicionar un lavado con CTAB10X (ver figura 15 y 16), se logró determinar que el tiempo adecuado en baño maría con CTAB2X es de 90min a 65 °C y con 2 pasos de CTAB10X a 65°C por 5 min cada uno.

### **6.4.2 Estimación de la cantidad de ADN**

Estandarizada la extracción de ADN, se realizó la cuantificación de manera visual comparando la primera banda del marcador (ADN lambda cortado con la enzima Pst1) con las bandas de las muestras, para ello se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.5% en la que se cargó 10 ul de cada muestra (1ul ADN y 9 ul de buffer de carga) y 10 ul de marcador, obteniendo bandas de muy buena calidad (sin degradación y sin ARN), pero con poca cantidad de ADN (ver figura 10).

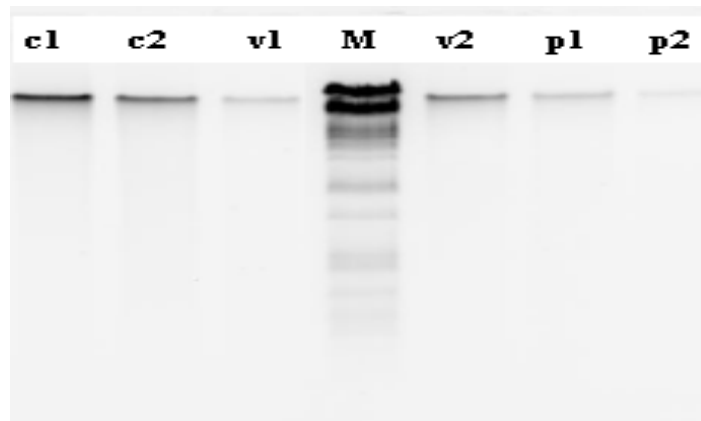


Figura 10- Estimación de ADN, M: primera banda del marcador representa 280 ng, c1: tratamiento control 100 ng, c2: tratamiento control 50 ng, v1: tratamiento con vertimec 30 ng, v2: tratamiento con vertimec 40 ng, p1: tratamiento con pentacloro 30 ng, p2: tratamiento con pentacloro 20 ng.

#### 6.4.3 Resultados de AFLPs

El ADN aislado de 55 muestras provenientes de los tratamientos, se analizó por la técnica de AFLP (Vos *et al.* 1995). No se observaron bandas polimórficas para las 6 combinaciones de cebadores. Para las 6 combinaciones de cebadores analizados (ver cuadro 1) en todos los tratamientos, no se encontró diferencias o a nivel de bandas (figura 11), finalmente se analizó los tratamientos con biocidas para la dosis con 50% de inhibición, que a su vez eran las dosis de uso normal, teniendo así 2 muestras de vertimec, 2 muestras de pentacloro, 2 muestras de tratamiento control y 2 muestras blanco (cebolla no sometida a experimentación) (ver figura 11). La fotografía del gel de electroforesis no exhibe la presencia de polimorfismos para las distintas combinaciones de cebadores utilizados. Se esperaba una posible aparición de polimorfismo producto de la acción biocida.



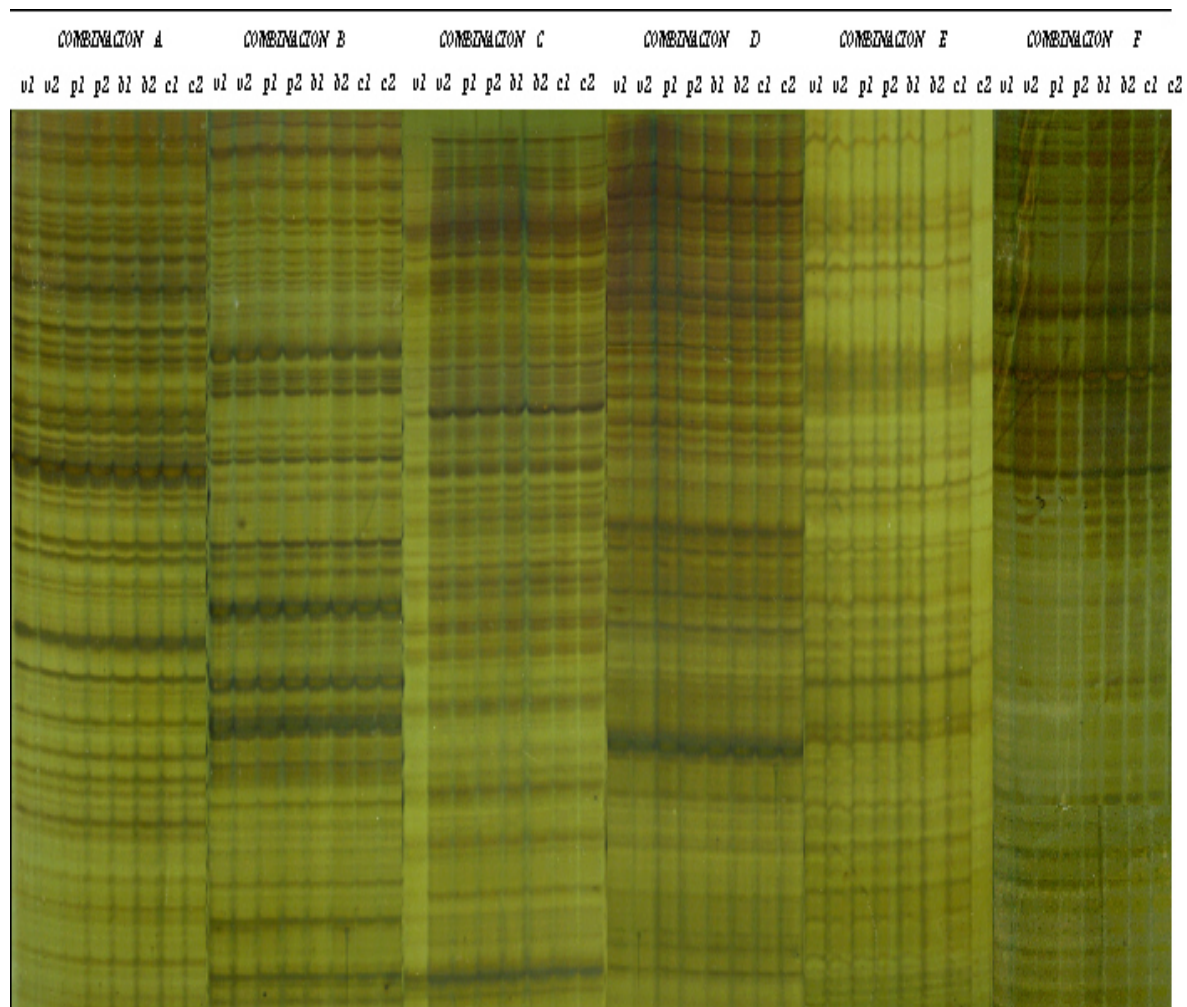


Figura 11- Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%, patrón de bandas de las 6 combinaciones de cebadores utilizadas. C: control con 2 repeticiones, b: blanco con 2 repeticiones, v: tratamiento con vertimec (Cl<sub>50</sub>) con 2 repeticiones, p: tratamiento con pentacloro (Cl<sub>50</sub>) con 2 repeticiones.

## VII. DISCUSION

Los biocidas tienen amplio espectro de actividad, un largo efecto residual y uso frecuente en la agricultura. Los estudios realizados sobre el efecto de los diferentes biocidas demuestran algunos efectos genotóxicos en las plantas (Tartar et al., 2006). El presente estudio se realizó para evaluar los posibles efectos genotóxicos, citológicos y moleculares inducidos por dos biocidas en células meristemáticas de raíz de *A. cepa*. Los cambios en actividades mitóticas como el índice mitótico, los índices de fase mitótica y la inducción de anomalías cromosómicas aparecieron en diferentes grados, dependiendo de la dosis y duración del tratamiento (ver figura 9.1 y 9.2). La alteración del índice mitótico puede ser debido a la interferencia del biocida en el proceso normal de mitosis, reduciendo el número de células que se dividen (Ghareeb y George, 1997; Badr, 1983). Otras investigaciones atribuyen la depresión de la actividad mitótica a la inhibición de la síntesis de proteínas (Kim y Bendixen, 1987). La inhibición mitótica también puede ser debido a la inhibición de la síntesis de ADN, lo que se considera como uno de los principales requisitos previos para que la célula se divida (Badr, 1983). Sin embargo, Chand y Ray (1981) informaron que la reducción de la fosforilación oxidativa que resulta en la baja del nivel de ATP en la célula podría ser otro factor de inhibición de la síntesis de ADN y ARN en las plantas con tratamiento de biocidas. Por otra parte, Wu y Grant (1967) informaron que los pesticidas en la célula pueden ejercer algún efecto sobre la función fundamental de una enzima; la producción, la inducción, la represión o la inhibición por retroalimentación podría ser una posible razón de la disminución del índice mitótico. En esta investigación, el índice mitótico disminuyó con el aumento de las concentraciones y la duración de los tratamientos (figura 8). Este resultado sugiere que los biocidas utilizados causan cambios citológicos e inducen una amplia gama de anomalías mitóticas en las células del ápice de raíz de *A. cepa*. Se ha obtenido resultados similares después de tratar a células de raíz de *Allium cepa* con insecticidas y pesticidas (Ajay y Sarbhoy, 1987; El-

Khodary et al, 1989). Sin embargo, el valor del aumento del índice de profase con el aumento de la concentración de la solución, así como la duración del tratamiento a excepción de unos pocos grupos (ver cuadro 7 y cuadro 9), se puede atribuir a la prolongación de la etapa de profase que afecta el eje de formación por la solución de los biocidas. Esta acumulación de profases fue similar a lo observado por El-Khodary et al. (1989) y Prasad y Das (1977), según ellos, el envenenamiento de las células ocurre en la etapa en que entran en mitosis, siendo detenidos en la profase. El resultado muestra la disminución en los índices de metafase, anafase y telofase con el aumento de la concentración (ver cuadro 7 y cuadro 9), debido a una prolongada profase o las células en división bloqueadas en profase que no permite entrar en las siguientes fases. Se observaron anomalías en todas las fases de la mitosis en las células tratadas. La frecuencia de anomalías poco a poco aumenta con la duración del tratamiento y la concentración de biocidas (ver cuadro 10). Trastornos anormales de profase, metafase y anafase fueron los principales tipos de anomalías detectadas. Se observaron puentes, retraso de citocinesis, metafase con cromosoma retrasado, células binucleadas en interfase y citocinesis desigual. Similares anomalías fueron registradas con el tratamiento de fluorochloridone en puntas de raíces de *A. cepa* por Yuzbasioglu et al., (2003) y tratamiento con el insecticida Ethion en puntas de raíces de *A. cepa* por Kabir et al, (2010). Profases con cromosomas anormales e irregulares fueron reportados por El-Khodary et al. (1990, 1989) en raíces de *A. cepa* tratadas con herbicida Tribunil y Garlon-4, la cantidad de anomalías en metafase fue superior a la ocurrida en anafase. Estas anomalías también podrían explicarse por una alteración en la organización del huso, causando una orientación irregular de los cromosomas (Grant, 1978; Mansour, 1984). Otra anomalía importante que se observó fue la naturaleza pegajosa de los cromosomas que podría ser debido al retraso en el movimiento de los cromosomas. Como resultado, los cromosomas no pudieron llegar a los polos y permanecieron dispersos en el citoplasma, presentándose de modo condensado y pegajoso (Ajay y Sarbhoy, 1988). Sin embargo, Klasterska et al. (1976)

sugiere que la rigidez de los cromosomas surgió debido a la doblez impropia de fibras de los cromosomas en una sola cromátida y por lo tanto son una mezcla de fibras, lo que hace a los cromosomas adherirse el uno al otro por medio de puentes de cromatina. El tipo más común de aberración en el presente estudio fue C-metáfase o c-mitosis inducida por altas dosis de Vertimec y Pentacloro. De acuerdo con Nagl (1970), el tratamiento con los insecticidas a las raíces causa el bloqueo del ciclo celular en metafase que posteriormente resulta en C-metáfase.

El tipo más observado de aberraciones en células en anafase es de anafase precoz. La formación de cromosomas precoces puede ser causada por la rigidez de los cromosomas (Kaur y Grover, 1985). Otras anomalías interesantes son los puentes cromosómicos que se han observado con frecuencia en los diferentes tratamientos. Esto podría ser debido a uniones por roturas cromosómicas generales (Tomkins y Grant, 1972; Badr, 1983).

Luego de estandarizar la extracción de ADN de cebolla, la comprobación de la calidad de ADN por electroforesis tuvo una resolución adecuada para su uso en AFLPs. El empleo de ésta técnica permitió la comparación de los patrones de corrida de las 8 muestras evaluadas. Al observar las 6 combinaciones de cebadores utilizadas, se puede constatar la presencia de bandas en los perfiles de corrida por cada combinación.

En los patrones de bandas obtenidos, todas las bandas están presentes en cada muestra con biocida y control, lo cual indica que dentro de los límites de resolución de la técnica los perfiles amplificados de los tratamientos con biocida son similares a los de las cebollas tratadas con agua potable.

Para la diferenciación de las muestras en estudio, se esperaba que las diferencias genéticas no fueran tan marcadas, debido a que se trata de una especie apomíctica obligada y exige reproducción clonal desde hace aproximadamente 5000 años.

Varias estrategias se han utilizado para determinar la estabilidad genética de los clones vegetales y se ha encontrado que la técnica de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) es muy sensible para la detección de variaciones entre individuos y entre especies; los marcadores AFLP han sido usados satisfactoriamente para evaluar la estabilidad genética en otros cultivos, como la papa (Vargas *et al.*, 2002) y el henequén (González, 2001); de aquí se deriva la importancia de la aplicación de este marcador en el estudio realizado. En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron referencias sobre el estudio de la estabilidad genética de la cebolla con el empleo de AFLP, pero si estudios de análisis de diversidad genética donde se encuentran estrecho margen genético entre variedades lo que sugiere la realización de estudios posteriores que amplíen estos conocimientos.

En ajo con el fin de evaluar el grado de diversidad genética e identificar duplicados de accesiones mediante el análisis de similitud (Vieira y Nodari, 2007), fueron evaluados 20 cultivares de ajo que conforman el Banco de germoplasma de Epagri (Brasil), mediante los marcadores RAPD. El índice de similitud revelado por los marcadores RAPD fueron generalmente elevados para la mayoría de variedades de la especie *A. sativum*, algunos de los cuales agrupados con el 100% de similitud, lo que sugiere que son cultivares potencialmente duplicados o que por lo menos las diferencias genéticas entre ellos son mínimas. En este sentido, Ipek *et al.* (2003) y Volk *et al.* (2004) señalan que los AFLPs han sido útiles para diferenciar clones de ajos que no habían podido ser individualizado con RAPD e isoenzimas.

Mediante el uso de AFLPs en *Hordeum vulgare* (cebada) se ha evaluado la estabilidad genética en plantas derivadas por androgénesis y embriogénesis somática, y se encontró un promedio del 6% de variación somaclonal, Bednarek *et al.* (2007); en *Papaver bracteatum* (adormidera de Siberia) se evaluó la estabilidad genética en plantas regeneradas de callos, y No se detectó variación somaclonal y se determino que las plantas eran híbridas. Carolan *et al.* (2002); en *Actinidia deliciosa* (kiwi) se

evaluo la variación genética en plantas regeneradas de callos Callos provenientes de hojas o tallo, observándose cierta variación entre clones (similitud del 73-90%), Prado *et al.* (2007); Etienne *et al.* (2002) en *Coffea arabica* y *C. canephora* (café) evaluo la variación somaclonal en embriones somáticos de híbridos mejorados, dependiendo del genotipo, se encontró entre 3% y 10% de variación somaclonal.

Sería interesante evaluar la frecuencia de la variación genética debido a biocidas en un curso de tiempo prolongado. Sin embargo está claro que la frecuencia de la variación dependerá del cultivo. Este hallazgo sugiere que puede haber una región específica el genoma de cebolla, que es extremadamente susceptible a la mutación generada por las condiciones de citotoxicidad por biocida. Parece posible que las mutaciones inducidas por biocidas, en algunos casos, se asemejan a las mutaciones somáticas que tuvieron lugar en la naturaleza y deben haber llevado a la formación de las diferentes variedades de esta especie estéril. Aunque estas hipótesis requieren una mayor investigación rigurosa.

En nuestro estudio, el análisis citológico de las puntas de las raíces de 55 plantas provenientes de una variedad comercial de cebolla, mostraron una frecuencia media de variación citogenética del 0.03 y una frecuencia de variación molecular mediante AFLPs de cero (coeficiente de similaridad igual al 100%).

Es un hecho bien documentado que *Allium cepa* expuesto a sustancias toxicas genera condiciones de estrés genómico que podrían resultar en roturas cromosómicas. Muchos estudios han indicado que las posiciones de ruptura no parecen ser al azar sino que se producen en una región de heterocromatina y podrían llevar a los cromosomas a una translocación, inversión o eliminación (Benzion y Phillip 1988; Lapitan *et al.* 1988). En *Allium sativum*, estas regiones de heterocromatina se encuentran en las regiones proximales del satélite de los cuatro cromosomas que

llevan la región de organización nucleolar y tienen la constricción secundaria (Sato y Kawamura, 1981).

En este estudio no hay una asociación clara entre la frecuencia de uniformidad molecular y la variación citogenética en el cultivo de cebolla. La frecuencia de tales cambios citogenéticos en los diferentes tratamientos no se correlacionan con la presencia de Polimorfismos AFLPs.

## VIII. CONCLUSIONES

- La presente investigación reveló que los biocidas usados ejercen un efecto mitodepresivo en las células del meristemo de la raíz de *Allium cepa*; teniendo la capacidad de producir aberraciones cromosómicas y efectos tóxicos a largo plazo.
- La presencia de cambios a nivel citogenético, se observó incluso en dosis por debajo de la dosis recomendada.
- La dosis recomendada de uso, es similar al  $CI_{50}$  para cada biocida, sin embargo esta produce anomalías en el ciclo celular.
- Tanto el  $CI_{50}$  y la inhibición mitótica al 50% coinciden con la dosis recomendada de uso V1 y P1 para vertimec y pentacloro respectivamente.
- Los AFLPs muestran uniformidad en *Allium cepa*, luego de exponerlos a biocidas.
- No hay correlación entre la variación citológica fenotípica y los niveles moleculares de uniformidad.

El método usado ha permitido conocer la citotoxicidad celular y genotoxicidad cromosómica, pero no la genotoxicidad a nivel molecular.

- La extracción de ADN en cebolla necesita de mayor tiempo en baño maría, para poder neutralizar los gases volátiles y ácidos presentes en su célula.
- Una buena calidad de ADN de cebolla implica 2 lavados con CTAB 10X, pero se obtiene una baja cantidad de ADN por ul (50ng/ul en promedio).

## **IX. RECOMENDACIONES**

Por lo presentado en esta investigación, se sugiere poner a prueba el potencial mutagénico de biocidas en una forma más amplia, sobre todo en sistemas que permiten recomendar un uso más amplio, en la agricultura.



## **X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

Ajay K., R. Sarbhoy. 1987. Cytogenetical studies on the effect of some chlorinated pesticides I. Effect on somatic chromosomes of Lens and Pisum. *Cytologia*, 52: 47-53.

Ajay K., R. Sarbhoy. 1988. Cytogenetic studies on the effect of some chlorinated pesticides. *Cytologia*, 53: 427-436.

Al-Zahim M. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *HortScience*, v.32, p.1102-1104.

Alberts et al (2004). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega. ISBN 54-282-1351-8

Badr A. 1983. Mitodepressive and cytotoxic activities of two herbicides in *Allium cepa*. *Cytologia*, 48: 451-457

Banerjee A. 1992. A time course study of the relative cytotoxic effects of extracts of different types of tobacco on *Allium cepa* mitosis. *Cytologia*, 57, 315-320.)

Baradon E., E. Frixione. 1982. *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Limusa, México D.F. 343 p.

Benzion G., Phillips R. 1988. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. *Genome* 30:318–325.

Blas R., J. Flores. 2010. Guía de marcadores moleculares aplicado al mejoramiento genético de plantas- IBT, UNALM. Mayo del 2010.

Carolan, J., I. Hook, J. Walsh, T. Hodgkinson. 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of *in vitro*-cultured *Papaver bracteatum* (Section *Oxytona*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 300–307.

Chand S. 1981. Effect of herbicide 2,4-dinitrophenol on mitosis, DNA, RNA and protein synthesis in *Nigella sativa*. *Biol. Plant*, 24: 198-202.

Chaverri, F., L. Soto, F. Ramírez, V. Bravo. 2000. Diagnóstico preliminar del uso de plaguicidas en los cultivos de arroz, banano, caña de azúcar, café, cebolla, melón, naranja, papa, piña, tomate, flores y plantas ornamentales. IRET, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 47 p.

El-Khodary S, A. Habib, A. Haliem. 1990. Effects of the herbicides Tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia*, 55: 209-215.

El-Khodary S., A. Habib, A. Haliem. 1989. Cytological effects of the herbicide Garlon-4 on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia*, 54: 465- 472.

Espinoza F., S. Palacio. A. Módenes, N. Szymanski. J. Silva, A. Rizzutto. 2007. Toxic effects on the *Allium cepa* L. roots by Cr6+-doped river waters. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Toledo PR Brazil, Universidade de São Paulo - São Paulo - São Paulo SP Brazil.

Etienne, H., S. Dussert, D. Fernandez, P. Lashermes, B. Bertrand. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 129-138.

Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*; 285: 35-44.

Feretti D., I. Zerbini, C. Zani, E. Ceretti, M. Moretti, S. Monarca. 2007. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addit. Contam.* 24 (6): 561-572.

Fiskesjo G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99–112.

Fiskesjo G. 1988. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197, 243–260.

Fiskesjo G. 1993. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8, 291–298.

Frainer M., C. Ferreira da Silva, T. Scotti do Canto-Dorow, S. Bosio. 2006. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells.

Genetics and Molecular Biology, 29, 3, 539-542. Copyright by the Brazilian Society of Genetics. Printed in Brazil.

García D. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG 2000;1(2):31- 41.

García H. 2000. Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem. [Tesis de Maestría.] Facultad de Biología UH. Diciembre del 2000.

Ghareeb A. 1997. Cytotoxicity of insecticide Temik 15G (Decarb) in mitotic and meiotic cells of *Vicia faba* plant. Cytologia, 62: 259-263.

González G. 2001. Embriogénesis somática en henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). 114 p. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas).

Grant W. 1978. Environmental Health Perspectives. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System Vol. 27, pp. 37-43.

Grant W. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium* A report of the US Environmental Protection Agency gene tox program. Mutation Research, 99, 273–291.

Grant W. 1994. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. Mutation Research, 310, 175–185.

Hartwell L., et al. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science 183: 46-51.

Hartwell L., M. Kastan. 1994. Cell cycle control and cancer. Science 266: 1821-28.

Hartwell L., T. Weinert. 1989. Checkpoint controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246: 629-34.

Ipek M., A. Ipek, P. Simon. 2003. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:246-252.

Jiménez J. 1995. Plaguicidas y salud en las bananeras de Costa Rica. Aseprola. San José, Costa Rica. 126 p.

Kabir L., K. Bimal, S. Pankaja, K. Amal, W. Sang, Y. Chang, S. Youn, R. Shyam. 2010. Genotoxicity evaluation of the insecticide ethion in root of *Allium cepa* L. African Journal of Biotechnology Vol. 9(27), pp. 4204-4210.

Kalcheva Vanya, A. Dragoeva. 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of Br-containing oxaphosphole on *Allium cepa* L. root tip cells and mouse bone marrow cells. Genetics and Molecular Biology, 32, 2, 389-393.

Kaur P., I. Grover. 1985. Cytological effects of some organophosphorus pesticides I. Mitotic effects. Cytologia, 50: 187- 197.

Kim J., E. Bendixen. 1987. Effect of haloxyfop and CGA-82725 on cell cycle and cell division of oat (*Avena sativa*) root tips. Weed Sci. 35: 769-774.

Klasterska I., A. Natarajan, C. Ramel. 1976. An interrelation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. Hereditas, 83: 153-162.

Konuk M., R. Liman, I. Cigerci. 2007. Determination of Genotoxic effect of Boron on *Allium cepa* root meristematic cells. Biology Department, Faculty of Science and Literature, Afyon Kocatepe University, 03200-Afyonkarshisar, Turkey. Pak. J. Bot., 39(1): 73-79.

Lapitan N., R. Sears, B. Gill. 1988. Amplification of repeated sequences in wheat rye hybrids regenerated from tissue culture. Theor Appl Genet 75:381-388

Mansour K. 1984. Cytological effects of the herbicide Tribunil on *Vicia faba*. Egypt. J. Bot. 27: 191-198.

Mustafa Y., E. Suna Arıkan. 2008. Destroy Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. Department of Biology, Faculty of Science and Arts, Afyonkarahisar Kocatepe University, 03200 Afyonkarahisar, Turkey. Caryologia Vol. 61, no. 1: 45-52.

Nagl W. 1970. The mitotic and endomitotic nuclear cycle in *Allium carinatum* II. Relations between DNA replication and chromatin structure. Caryologia, 23: 71-78.

Olufunsho A., A. Akintonwa, O. Sunday. 2010. Mutagenic Screening of Crude Oil Fractions Using Modified Ames Test and *Allium cepa* (Linn) Assay. American Journal of Pharmacology and Toxicology 5 (1): 1-8, 2010, ISSN 1557-4962, Science Publications.

Olusegun S., I. Fidelia, P. Odeigah. 2010. Cytogenotoxicity evaluation of two industrial effluents using *Allium cepa* assay. African Journal of Environmental Science and Technology Vol. 4(1) pp. 021-027, January 2010.

Palani L., N. Panneerselvam. 2007. Cytogenetic studies of food preservative in *Allium cepa* root meristem cells. Research Centre and Post Graduate Studies in Botany, The Madura College, Madurai, India. Medicine and Biology Vol.14, No 2, 2007, pp. 60 – 63

Paniagua R., M. Nistal, P. Sesma. (2002). *Citología e histología vegetal y animal*. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.. ISBN 84-486-0436

Peña C., B. Añez, M. Dávila. 1999. Respuesta de la cebolla (*Allium cepa* L.) a la aplicación de azufre, magnesio, cinc y boro en un suelo alcalino. Universidad de

Peña S. 1987. Estadística. Modelos y Métodos. Volumen 2. Alianza Editorial. Madrid. ISBN: 84-206-8110-5.

Prado, M., M. Gonzalez, S. Romo, M. Herrera. 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 88: 1–10.

Prasad G., K. Das. 1977. Effect of some growth substances on mitosis. *Cytologia*, 42: 323-329.

Ragunathan, J. Zhejiang. 2007. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in *Allium cepa*. *Univ Sci B* 8(7):470-475

Rank J. 2003. The method of *Allium* anaphase – telophase chromosome aberration assay. Department of environment, technology social studies. *Ekologija* ( Vilnius).

Rank J., M. Nielsen. 1997. *Allium* anaphase-telophase genotoxicity assay. Department of Environment, Technology and Social Studies, Roskilde University, Denmark.

Rosales F., L. Molina. 2007. Diversidad genética de poblaciones de ajo (*Allium sativum* L.) cultivadas en Guatemala, definida por Marcadores. de ADN. *Agronomía Mesoamericana* 18(1): 85-92. 2007 ISSN: 1021-7444

Sato S., S. Kawamura. 1981. Cytological studies on the nucleolus and the NOR-carrying segments of *Allium sativum*. *Cytologia* 46:781–790

Shukla Y., A. Arora, P. Taneja. 2002. Anti-mutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. *Mutat. Res.*, 515:197-202.

Sigurbjörhsson B. 1971. Induced mutations in plants. *SciAm.* (Jan) 224:86-95.



Srivastava R., D. Kumar. 2005. Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. Cell Biology Section, Industrial Toxicology Research Centre, P.O. Box 80, M.G. Marg, Lucknow 226 001, India. Department of Botany, University of Lucknow, Lucknow 226 007, India. Available online 31 May 2005.

Tartar G., F. Kaymak, F. Gokalp. 2006. Genotoxic Effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. Trakya University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, 22030 Edirne, TURKIYE. CARYOLOGIA Vol. 59, no. 3: 241-247.

Tomkins D., W. Grant. 1972. Comparative cytological effects of the pesticides Menazon, Metobromuron and Tetrachloriosphthalonitrile in *Hordeum* and *Tradescantia*. Can. J. Genet. Cytol. 14: 245-256.

Ukaegbu M., P. Odeigah. 2009. The Genotoxic Effect of Sewage Effluent on *Allium Cepa*. Department of Cell Biology and Genetics, University of Lagos, Akoka, Lagos, Nigeria. Report and Opinion, 2009:1(6)

Vargas D., J. Castillo, A. Estévez, M. Hernández. 2002. Empleo de la técnica AFLP para la detección de variabilidad en material conservado *in vitro* en el cultivo de la papa (*S. Tuberosum* L.) En: Congreso Científico del INCA (13: 2002, nov 12-15, La Habana) Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2002. ISBN 959-7023-22-9.

Vieira R., R. Nodari. 2007. Genetic diversity of garlic revealed by RAPD markers. *Ciência Rural*, Santa Maria, V.37, N.1, P.51-57. ISSN 0103-8478.

Volk G., A. Henk, M. Richards. 2004. Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:559-569.

Vos P., R. Hoger. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, No. 21 4407-4414.

Wesseling C. 1997. Health effects from pesticide use in Costa Rica: an epidemiologic approach. Tesis Medicine Docktorsexamen, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia. 308 p.

Wuu K., W. Grant. 1967. Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in meiotic cells of Barley (*Hordeum vulgare*). *Can. J. Genet. Cytol.* 8: 481-501.

Yuzbasioglu D., F. Unal, C. Sancak, R. Kasap. 2003. Cytological effects of the herbicide racer flurochloridone on *Allium cepa*. *Caryologia*, 56: 97-105.

#### **Referencias electrónicas:**

[http://www.serfi.com.pe/INTERIOR/productos\\_peru/pentacloro\\_saume.html](http://www.serfi.com.pe/INTERIOR/productos_peru/pentacloro_saume.html)

<http://www.syngenta.com/country/cl/cl/soluciones/proteccioncultivos/Paginas/Vertimec.aspx>

## XI. ANEXO

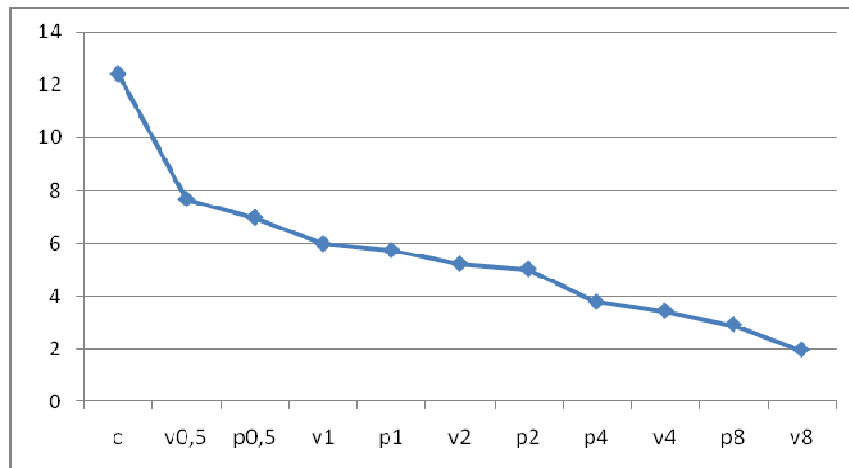


Figura 12- Tamaño de raíz en la cuarta medición para cada tratamiento

Cuadro 6- desarrollo radicular en la última medición

tratamiento	Longitud de raíz (cm)	CI
c	12.416	0
v0,5	7.668	0.382
p0,5	6.976	0.438
v1	5.976	0.519
p1	5.732	0.538
v2	5.218	0.58
p2	5.026	0.595
p4	3.776	0.696
v4	3.436	0.723
p8	2.916	0.765
v8	1.962	0.842

## Matriz 1- Resultados de las pruebas estadísticas obtenidas mediante el SAS

The SAS System

15:03 Tuesday, June 17, 2010

OBS	TRAT	Y
1	c	12.00
2	c	10.80
3	c	13.83
4	c	11.75
5	c	13.70
6	v0.5	7.81
7	v0.5	7.71
8	v0.5	6.97
9	v0.5	8.10
10	v0.5	7.75
11	v1	6.13
12	v1	5.88
13	v1	5.64
14	v1	6.23
15	v1	6.00
16	v2	5.10
17	v2	4.94
18	v2	5.40
19	v2	5.75
20	v2	4.90
21	v4	3.38
22	v4	3.50
23	v4	3.00
24	v4	3.42
25	v4	3.88
26	v8	2.25
27	v8	2.56

## Continuación

28	v8	2.00
29	v8	1.50
30	v8	1.50
31	p0.5	6.36
32	p0.5	6.33
33	p0.5	8.00
34	p0.5	7.31
35	p0.5	6.88
36	p1	5.83
37	p1	5.44
38	p1	5.50
39	p1	5.79
40	p1	6.10
41	p2	4.88
42	p2	4.89
43	p2	5.58
44	p2	4.58
45	p2	5.20
46	p4	3.64
47	p4	3.78
48	p4	4.10
49	p4	3.50
50	p4	3.86
51	p8	2.50
52	p8	2.58
53	p8	3.10
54	p8	2.90
55	p8	3.50

# Analysis of Variance Procedure

TRAT 11 c p0.5 p1 p2 p4 p8 v0.5 v1 v2 v4 v8

Number of observations in data set = 55

## Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	10	408.4414109	40.8441411	135.54	0.0001
Error	44	13.2589600	0.3013400		
Corrected Total	54	421.7003709			

R-Square	C.V.	Root MSE	Y Mean
0.968558	9.882473	0.548944	5.554727

## Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: Y

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	10	408.4414109	40.8441411	135.54	0.0001

Duncan's Multiple Range Test for variable: Y

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate, not  
the experimentwise error rate

Alpha= 0.01 df= 44 MSE= 0.30134

Number of Means    2     3     4     5     6     7     8     9     10    11

Critical Range   0.935 0.975 1.002 1.021 1.037 1.050 1.061 1.070 1.078 1.084

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	TRAT
A	12.4160	5	c
B	7.6680	5	v0.5
B			
B	6.9760	5	p0.5
C	5.9760	5	v1
C			
C	5.7320	5	p1
C			
C	5.2180	5	v2
C			
C	5.0260	5	p2
D	3.7760	5	p4
D			
D	3.4360	5	v4
D			
D	2.9160	5	p8
E	1.9620	5	v8

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: Y

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.01 df= 44 MSE= 0.30134

Critical Value of Studentized Range= 5.642

Minimum Significant Difference= 1.3851

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	12.4160	5	c
B	7.6680	5	v0.5
B			
C B	6.9760	5	p0.5
C			
C D	5.9760	5	v1
C			
C D	5.7320	5	p1
D			
D	5.2180	5	v2
D			
E D	5.0260	5	p2
E			
E F	3.7760	5	p4
F			
F	3.4360	5	v4
F			
G F	2.9160	5	p8
G			
G	1.9620	5	v8



Dunnett's T tests for variable: Y

NOTE: This tests controls the type I experimentwise error for  
comparisons of all treatments against a control.

Alpha= 0.01 Confidence= 0.99 df= 44 MSE= 0.30134

Critical Value of Dunnett's T= 3.454

Minimum Significant Difference= 1.1993

Comparisons significant at the 0.01 level are indicated by '\*\*\*'.

TRAT Comparison	Simultaneous		Simultaneous	
	Lower	Difference	Upper	
	Confidence Limit	Between Means	Confidence Limit	
v0.5 - c	-5.9473	-4.7480	-3.5487	***
p0.5 - c	-6.6393	-5.4400	-4.2407	***
v1 - c	-7.6393	-6.4400	-5.2407	***
p1 - c	-7.8833	-6.6840	-5.4847	***
v2 - c	-8.3973	-7.1980	-5.9987	***
p2 - c	-8.5893	-7.3900	-6.1907	***
p4 - c	-9.8393	-8.6400	-7.4407	***
v4 - c	-10.1793	-8.9800	-7.7807	***
p8 - c	-10.6993	-9.5000	-8.3007	***
v8 - c	-11.6533	-10.4540	-9.2547	***

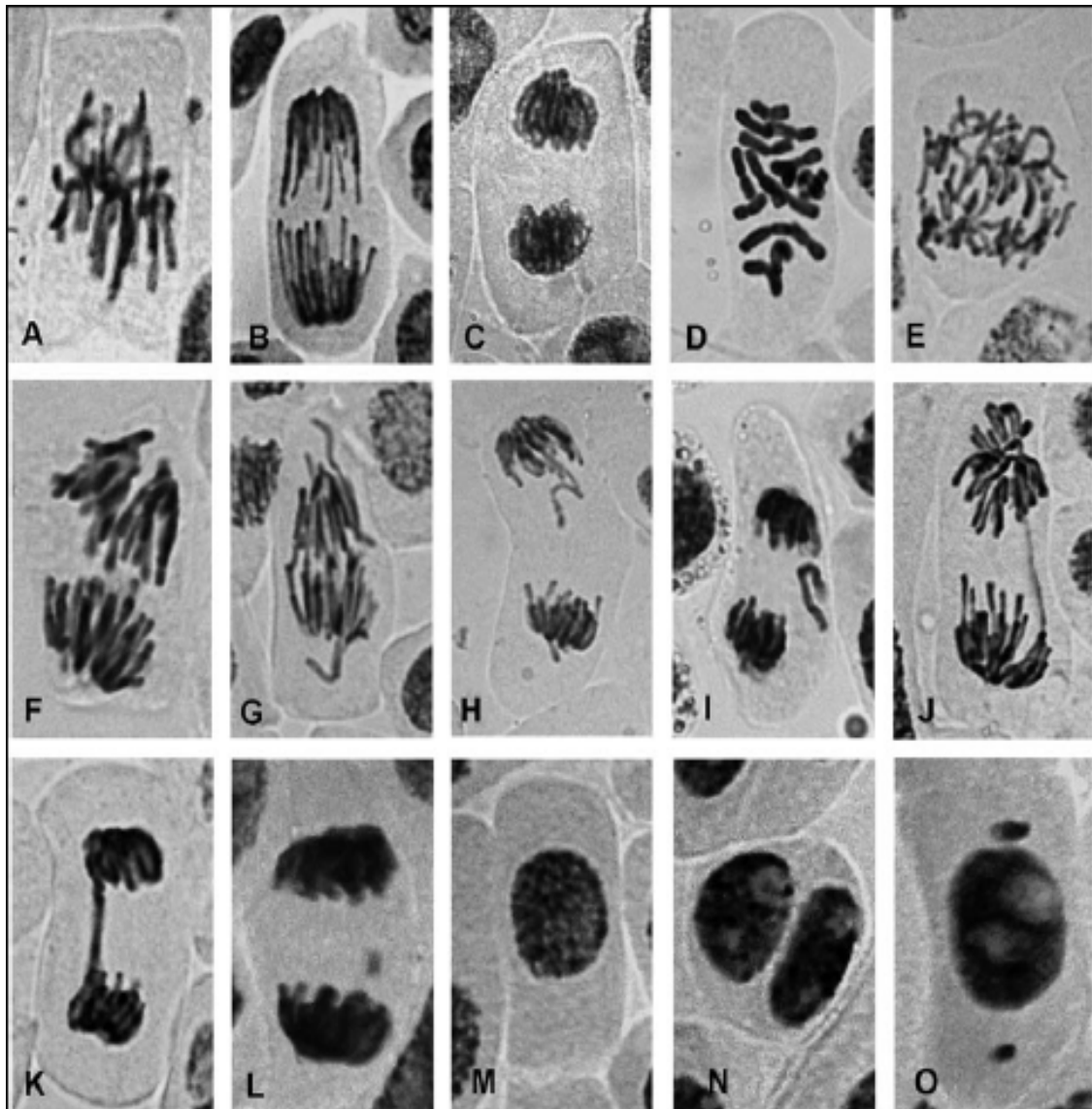


Figura 13- Aberrations induced by Br-oxph in *Allium cepa* root tips: A - normal metaphase, B - normal anaphase, C - normal telophase, D,C - mitosis, E, F- Spindle abnormalities in anaphase, G - vagrant chromosome in anaphase, H, I - vagrant chromosome in anaphase-telophase, J - anaphase bridge, K - anaphase-telophase bridge, L - anaphase-telophase with fragment, M - normal interphase cell, N - binucleated cell, O - micronuclei in interphase cell. (Kalcheva, 2009)

Cuadro 7- cantidad de células observadas por fase en cada tratamiento

	<b>Profase</b>	<b>Metafase</b>	<b>Anafase</b>	<b>Telofase</b>	<b>Mitosis</b>	<b>Interfase</b>	<b>Total</b>
Control	209	119	61	71	460	2346	2806
V0.5	167	69	36	32	304	2436	2740
V1	115	47	23	21	206	2588	2794
V2	135	38	12	9	192	2586	2778
V4	80	17	8	5	110	2692	2802
V8	49	5	3	3	60	2750	2810
P0.5	172	64	31	33	300	2496	2796
P1	123	41	21	15	200	2296	2758
P2	130	31	17	6	184	2594	2778
P4	85	19	10	4	118	2700	2818
P8	62	9	6	3	80	2734	2814
Número de células contabilizadas							30694

Cuadro 8- índices mitóticos y porcentajes de inhibición mitótica para cada tratamiento

<b>tratamiento</b>	<b>IM (índice mitótico)</b>	<b>% de inhibición de la mitosis</b>
Control	0.1639	0
V0.5	0.1109	32.34
V1	0.0737	55.03
V2	0.0691	57.84
V4	0.0393	76.02
V8	0.0214	86.94
P0.5	0.1073	34.53
P1	0.0725	55.77
P2	0.0662	59.61
P4	0.0419	74.44
P8	0.0284	82.67

Cuadro 9- Índices de fase mitótica para cada tratamiento

	<b>Profase</b>	<b>Metafase</b>	<b>Anafase</b>	<b>Telofase</b>
Control	0.454	0.259	0.133	0.154
V0.5	0.549	0.227	0.118	0.105
V1	0.558	0.228	0.112	0.102
V2	0.703	0.198	0.063	0.047
V4	0.727	0.155	0.073	0.045
V8	0.817	0.083	0.050	0.050
P0.5	0.573	0.213	0.103	0.110
P1	0.615	0.205	0.105	0.075
P2	0.707	0.168	0.092	0.033
P4	0.720	0.161	0.085	0.034
P8	0.775	0.113	0.075	0.038

Cuadro 10- Anomalías encontradas en los distintos tratamientos

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>Puente anafasico</b>	<b>Células binucleadas</b>	<b>C- mitosis</b>	<b>Células con micronúcleos</b>	<b>otros</b>
C	-	-	-	-	-
p0.5	-	2	-	-	-
P1	-	-	2	-	-
P2	2	-	2	-	1
P4	-	-	1	1	4
P8	-	-	1	-	7
v0.5	-	1	1	-	-
V1	2	-	2	-	-
V2	-	-	3	1	2
V4	-	-	2	-	5
V8	-	-	1	-	8

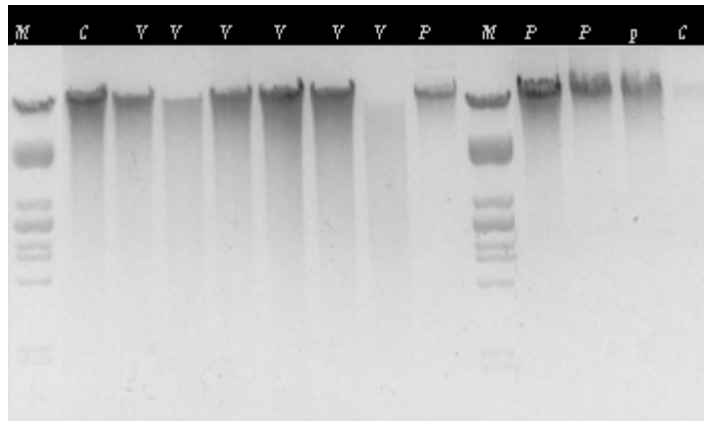


Figura 14 - Primeros resultados de calidad y cuantificación de ADN, usando el protocolo inicial.

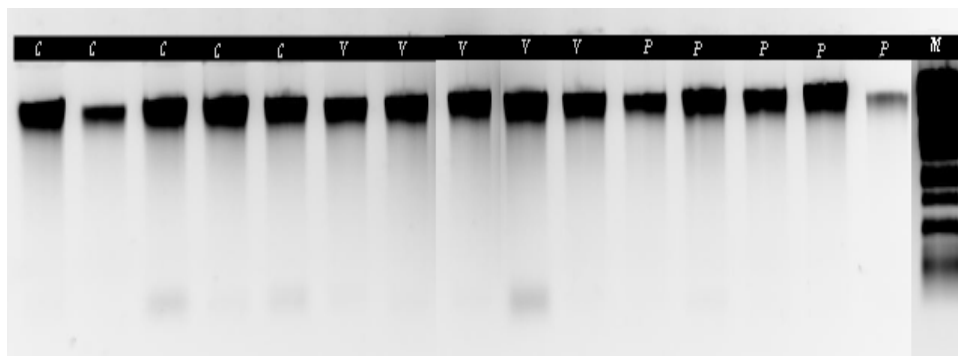


Figura 15 - Cuantificación y calidad de ADN con baño maria 70 min un lavado con CTAB10X

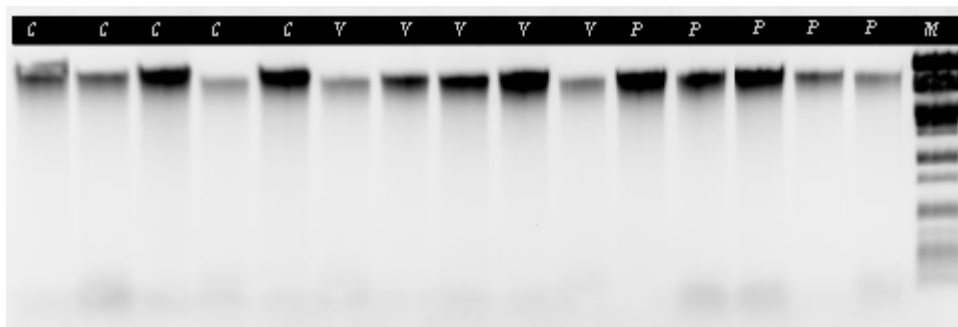


Figura 16 - Cuantificación y calidad de ADN con baño maría 70 min y dos lavados con CTAB10X

## XII. ADENDA

**12.1** La **mutagénesis** se refiere a la inducción de cambios permanentes y transmisibles en la estructura del material genético, afectando a un único gen o a varios. La **Genotoxicidad** es la capacidad de una sustancia para interactuar con el ADN. Los ensayos de genotoxicidad y mutagénesis son importantes para evaluar el riesgo de los productos. Debido a que son fenómenos complejos, no existe un único ensayo capaz de detectar estas alteraciones (Sigurbjorhsson B. 1971). La **Inestabilidad Genética** ocurre cuando en una especie con un cariotipo estable, se producen variaciones que modifican al azar el número normal de cromosomas, o bien se observan alteraciones estructurales (deleciones, translocaciones, etc.) que modifican el complemento cromosómico celular, se dice que presenta **inestabilidad genómica** (genética, o cromosómica), (Ukaegbu M., P. Odeigah. 2009).

**12.2** Los **Biomonitores** son aquellos sistemas vivos que nos indican la presencia de perturbaciones o contaminantes, y que nos dicen además cuán fuerte es la alteración, ya que entre mayor es la perturbación o la cantidad de contaminantes, mayor es también su respuesta (Srivastava R., D. Kumar. 2005).

**12.3** El **sistema de control** del ciclo celular es un dispositivo bioquímico compuesto por un conjunto de proteínas reguladoras interactivas: las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas que inducen y coordinan los procesos básicos del ciclo, como la duplicación de ADN y la división celular. Durante un ciclo típico, el sistema de control está regulado por factores de retraso que pueden frenar el ciclo en puntos determinados denominados puntos de control (Hartwell L y Weinert T. 1989). La **proteína p53** ante la presencia de ADN dañado genera una señal que retrasa la entrada en fase M (Hartwell L. y Kastan M. 1994). El gen p53 es uno de los genes supresores de tumores más conocidos, que no sólo detiene el ciclo (arresto celular), sino también participa en la apoptosis (muerte celular programada) forzando a las



células al suicidio cuando el daño en el ADN es irreparable (Hartwell L., et al. 1974). La proteína p53 activa la transcripción del gen p21, que codifica a la proteína p21 y esta última proteína ejerce su efecto inhibidor uniéndose al complejo ciclina-Cdk2, deteniendo el ciclo. Cuando el ADN es reparado, la proteína p53 se libera del promotor del gen p21, provocando el descenso en los niveles de p21. Esto permite restaurar la actividad del complejo ciclina-Cdk2 (Baker B., et al.1976).

**12.4 Los biocidas** pueden ser sustancias químicas sintéticas o de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre. Por lo general actúan a nivel de la membrana células del microorganismo, penetrándola y destruyendo los sistemas que permiten vivir al microorganismo.

#### **12.4.1 Vertimec 1.8 EC**

Controla las razas de insectos plaga que han desarrollado resistencia a otros productos de tipo convencional. Ideal como eje central en programas de rotación y de manejo de resistencia.

(<http://www.syngenta.com/country/cl/cl/soluciones/proteccioncultivos/Paginas/Vertimec.aspx>.)

#### **12.4.2 Pentacolor Saume**

Pentacolor Saume es un fungicida que se usa en el tratamiento de semilla para prevenir enfermedades originadas por hongos provenientes del suelo o transmitidas por semilla. ([www.serfi.com.pe/INTERIOR/productos\\_peru/pentacolor\\_saume.html](http://www.serfi.com.pe/INTERIOR/productos_peru/pentacolor_saume.html)).